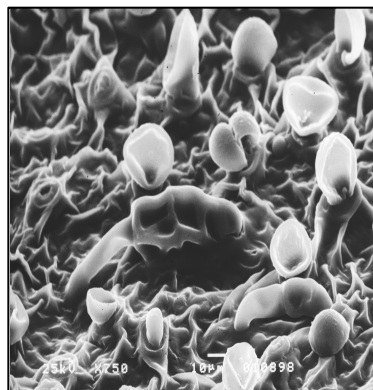
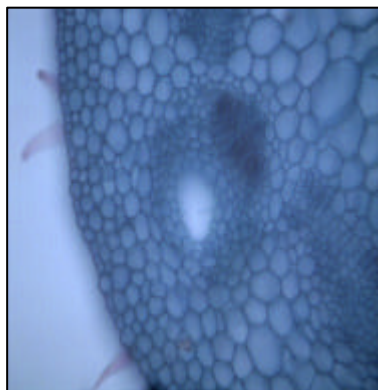


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**REGENERAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDO ANATÔMICO DE AROEIRA DA PRAIA
Schinus terebinthifolius Raddi.**



ALESSANDRA MARIA DE SOUSA PAIVA

Natal / RN

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Alessandra Maria de Sousa Paiva

**REGENERAÇÃO *IN VITRO* E ESTUDO ANATÔMICO DE AROEIRA
DA PRAIA *Schinus terebinthifolius* Raddi.**

Orientador: Prof^o. Dr^o. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa

Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia/CB/UFRN

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Sob orientação do Prof^o Dr^o. Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa.

NATAL / RN

Março de 2007

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede
Paiva, Alessandra Maria de Sousa.

Regeneração *in vitro* e estudo anatômico de aroeira da praia *schinus terebinthifolius raddi* /
Alessandra Maria de Sousa Paiva. – Natal [RN], 2007.

92 f.

Orientador: Magdi Ahmed Ibraim Aloufa.

Dissertação (Mestrado)– Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. *schinus terebinthifolius raddi* - Dissertação. 2. Aroeira de praia – micropropagação - Dissertação. 3. Regeneração *in vitro* - Dissertação. 4. Organogênese - Dissertação. I. Aloufa, Magdi Ahmed Ibraim. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 582.765(043.3)

Ao meu marido Álvaro e minha filha Livia

DEDICO

“Se estamos neste mundo para amadurecer, aprender a viver melhor, temos de usar nossos recursos, buscar o jeito certo de formatar as energias vitais, desenvolver nosso mundo interior, criar o lugar e a maneira como desejamos viver. Esse é um direito nosso. Todos somos livres e vivemos no mundo que criamos. Se ele não está bom, temos o recurso de mudá-lo, revendo nossas atitudes, observando os fatos da vida, experimentando até conseguirmos um resultado melhor. A felicidade é conquistada assim” (Lucius)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças para superar os obstáculos e por tornar possível à concretização de mais um sonho.

Aos meus pais, pela educação recebida e pela força para seguir em frente.

Ao meu esposo Álvaro, pela compreensão e dedicação nos momentos em que mais precisei.

À minha filha Lívia, pelos abraços carinhosos quando eu chegava em casa.

Ao professor Dr^o Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa pela oportunidade, apoio e orientação.

À professora Dr^a Juliana Espada Lichiston pela contribuição, apoio e dedicação.

À Professora Dr^a Maria das Dores Melo, pelos ensinamentos que me ajudaram a chegar até aqui e também pela sua amizade e carinho.

À Najara, simplesmente por tudo e toda ajuda nestes dois anos. Pelas conversas pessoais, pelo ombro amigo, muita paciência e momentos divertidíssimos. Muito obrigada.

À Kelly, pois mesmo antes de me conhecer não exitou em oferecer ajuda e por termos nos tornado grandes amigas.

Ao André, pelas correções, idéias, sugestões, muita paciência e muitos momentos divertidos durante esse trabalho e será, com certeza, um amigo para sempre.

A todos do laboratório de Biotecnologia Vegetal, em especial a Jailma, por transmitir tanta paz e carinho.

À minha turma de mestrado: Anileide, Bianca, Milena, Viviane e Rubens, pelo companheirismo.

Enfim, a todos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram na elaboração e conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS	13
1.2 USO DAS PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL	14
1.3. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS	17
1.4 AROEIRA: USOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL.	19
1.4.1 Uso comercial	19
1.4.2 Importância medicinal	20
1.5 PROPAGAÇÃO DA AROEIRA	21
1.6 CULTURA DE TECIDOS	22
1.6.1 Micropropagação	23
1.6.2 Organogênese	25
1.6.3 Oxidação Fenólica	25
1.7 MORFOLOGIA E ANATOMIA VEGETAL	26
2. OBJETIVOS DA PESQUISA	34
2.1 OBJETIVO GERAL	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
CAPITULO 2	35
ARTIGO 1 - REGENERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE AROEIRA DA PRAIA <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	37
ARTIGO 2 - CONTROLE DA OXIDAÇÃO NO ESTABELECIMENTO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS DE AROEIRA DA PRAIA <i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI	49
ARTIGO 3 - ESTUDO ANATÔMICO COMPARATIVO DE <i>Schinus terebinthifolius</i> RADDI EM PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> .	62
CAPITULO 3	76

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	77
CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
CAPÍTULO 4	90
APÊNDICE	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANA	ácido naftaleno acético
AIA	Ácido Indol Acético
AIB	Ácido indolbutirico
BAP	6-Benzilaminopurina
CDL	Convenção Sobre Diversidade Biológica
COL	Colênquima
CV	Câmbio Vascular
END	Endoderme
EP	Epiderme
FL	Floema
FAA	Formaldeido, Ácido Acético e Álcool Etilico
GA ₃	Ácido giberélico
g.L ⁻¹	Gramas por litro
mg.L ⁻¹	Miligramas por litro
mL	Mililitros
MS	Meio de cultura de Murashige e Skoog (1962)
OMS	Organização mundial de saúde
PE	Periderme
PC	Parênquima cortical
PP	Parênquima paliçádico
PL	Parênquima lacunoso
PI	Parênquima indiferenciado
PM	Parênquima medular
PVP	Polivinilpirrolidone
pH	Potencial Hidrogeniônico
XI	Xilema primário
XII	Xilema secundário
µm	Micrômetro

RESUMO

Este trabalho aplica técnicas de culturas de tecidos vegetais para o estabelecimento de protocolos de micropropagação da aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi, tendo como objetivos determinar os meios ideais de cultura para a multiplicação de brotos, reduzir o nível de oxidação no cultivo *in vitro* e caracterizar anatomicamente os órgãos vegetativos desenvolvidos *in vitro* e *ex vitro*. Segmentos nodais, internodais, apicais e cotiledonares foram cultivados em meio MS suplementado com 3% de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol e diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP): 0, 2,25, 4,5, 9,0 e 18,0 µM. As principais características avaliadas foram taxa de indução, número e altura dos brotos. Foi estudado o efeito dos seguintes antioxidantes: carvão ativado (3,0, 5,0 e 10 g.L⁻¹), ácido ascórbico (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) e polivinilpirrolidone (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) sobre a taxa de oxidação e o número de brotos em segmentos nodais da *Schinus terebinthifolius*. Foram feitos estudos anatômicos da raiz, caule e folha dessa espécie com técnicas usuais em anatomia vegetal. Dentre as análises realizadas, apenas os segmentos nodais mostraram bons resultados na propagação *in vitro*. Os segmentos nodais tratados com 2,25 e 4,5 µM de BAP proporcionaram as maiores taxas de indução, número médio de brotos e altura, diferindo significativamente do tratamento controle. Os meios contendo 10 g.L⁻¹ de carvão ativo e 200 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico proporcionaram os melhores resultados para redução da oxidação polifenólica e apenas o carvão ativo na concentração de 10 g.L⁻¹ promoveu regeneração de brotos. No estudo anatômico, a raiz de *Schinus terebinthifolius* desenvolvida em casa de vegetação apresenta crescimento secundário e ductos secretores. *In vitro*, a raiz é tetrarca e encontra-se em crescimento primário, não apresentando ductos. Em ambas as condições de cultivo, a folha é anfiestomática, com parênquimas paliçádico e lacunoso bem definidos, ductos secretores, drusas e tricomas glandulares e tectores, diferenciando no número de ductos secretores. O caule possui epiderme pluriestratificada, cutícula delgada, tricomas tectores e ductos secretores próximos à periferia. Pode-se concluir que a micropropagação da aroeira é possível em meio MS suplementado com 4,5 µM de BAP com ou sem carvão ativado e que o cultivo *in vitro* não induz alterações anatômicas significativas.

Palavras-chave: Micropropagação, organogênese direta, controle de oxidação, anatomia.

ABSTRACT

This work applies techniques of plant tissue culture for the establishment of micropropagation protocols of aroeira *Schinus terebinthifolius*, having as objectives to determine the ideal culture media for *in vitro* multiplication of shoots, to reduce the oxidation levels in the *in vitro* culture and to characterize anatomically the vegetative organs developed *in vitro* and *ex vitro*. Nodal, internodal, apical and cotyledonar segments were cultivated on MS medium supplemented with 3% of sucrose, 0.1 g.L⁻¹ of myo-inositol and different concentrations of 6-Benzilaminopurine (BAP): 0, 2.25, 4.5, 9.0 and 18.0 µM. The characteristics evaluated were the induction and number shoots and their respective height. The effect of the antioxidants activated charcoal (3.0, 5.0 e 10 g.L⁻¹), ascorbic acid (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) and polivinilpirrolidone (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) on the reduction of oxidation rate and shoot number in nodal segments was studied. Anatomical study of the roots, stems and leaves of this species were made with usual techniques in plant anatomy. Among the accomplished analyses, just the nodal segments showed good results in *in vitro* propagation. The nodal segments treated with 2.25 and 4.5 µM of BAP provided high induction rates, number and height of shoots, differing significantly of the control treatment. The media containing 10 g.L⁻¹ of activated charcoal and 200 mg.L⁻¹ of ascorbic acid provided the best results for reduction of phenolic oxidation and just the activated charcoal in 10 g.L⁻¹ concentration allowed shoot regeneration. In the anatomical study, roots of *Schinus terebinthifolius* developed in greenhouse present secondary growth and secretory ducts. *In vitro* roots are tetrarch and present primary growth, without ducts. In both conditions of cultivation, the leaf is amphiestomatic, with palisade and spongy parenchyma, secretory ducts, druses and glandular and non-glandular trichomes, differing on the number of ducts. The results allow to conclude that micropropagation of aroeira is possible in MS medium supplemented with 4.5 µM of BAP with or without activated charcoal and the *in vitro* cultivate doesn't induce significant anatomical alterations.

Key words: Micropropagation, direct organogenesis, oxidation control, anatomy.

A photograph of a tree with green leaves and clusters of red berries against a clear blue sky. The text "CAPÍTULO 1" is overlaid in the center.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Dados literários sobre a utilização de espécies vegetais para a cura de doenças e outros males são encontrados desde 50.000 anos atrás. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas como nutrição, reprodução e proteção. Pelas suas experiências e observações, descobriu nas plantas e ervas soluções para o tratamento de injúrias ou doenças. Além das plantas benéficas, descobriram vegetais, capazes de matarem e produzir alucinações. Aos homens primitivos que detinham todos esses conhecimentos, foram atribuídos poderes sobrenaturais e passaram a ser considerados mágicos, curandeiros ou feiticeiros (MIGLIATO, 2005).

O Brasil possui o maior patrimônio de diversidade genética vegetal do planeta, porém investe pouco nas pesquisas em bioquímica, genética e fisiologia referentes às plantas medicinais. As reservas naturais estão sendo sistematicamente destruídas e milhares de espécies estão se extinguindo antes de serem pesquisadas. Além disso, os altos custos de importação fazem com que se tenha a necessidade de buscar soluções próprias para o desenvolvimento de tecnologias farmacêuticas (COSTA, 1995).

A exploração de plantas nativas na medicina popular é largamente difundida no país. A maioria das espécies tem sido usada de forma extrativista, o crescimento da população humana e a ocupação de áreas naturais vêm aumentando a pressão destrutiva sobre esta flora.

A cultura de tecidos oferece meios que permitem a conservação *in vitro* de espécies ameaçadas, onde o seu material genético será preservado, estando inclusive disponível para trabalhos futuros (ABREU, 1998). A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada micropropagação, por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e a de maior impacto (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

A aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi é uma espécie com propriedades medicinais muito utilizadas por populares como antiinflamatório e cicatrizante principalmente na região Nordeste do Brasil. Além do uso medicinal a aroeira, é fornecedora de madeira, sendo utilizada em diversos tipos de obras principalmente em cercas de propriedades devido a sua resistência (MATOS, 2002).

A micropropagação da aroeira configura-se como uma importante ferramenta por permitir a produção de um grande número de plantas geneticamente uniformes, uma vez que esta espécie apresenta propriedades medicinais extensamente exploradas por populares, principalmente na região Nordeste do Brasil onde é muito empregada no tratamento de inflamações uterinas. A espécie *S. terebinthifolius* tem sido também utilizada por indústrias farmacêuticas com boa aceitação pelo mercado consumidor. Um exemplo dessa aplicação é a

pomada ginecológica e o sabonete líquido Kronel® fabricada pelo laboratório Hebron que investe em pesquisas de medicamentos a base de extrato de plantas medicinais.

Devido ao uso intensivo da aroeira, faz-se necessário um estudo mais aprofundado de modo a garantir a permanência desta espécie, utilizando-se de ferramentas como as técnicas de cultura de tecidos, que permitem a reprodução em grande escala. Este procedimento pode favorecer os pequenos e médios laboratórios farmacêuticos nacionais dedicados à produção de medicamentos de origem vegetal.

Este trabalho teve como objetivo estabelecer protocolos viáveis para a micropropagação de aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi, possibilitando a produção de mudas de alta qualidade fitossanitária e genética, que poderão ser utilizadas pelas indústrias farmacológicas para extração do princípio ativo, evitando a retirada do material vegetal de forma extrativista.

Visando comprovar a eficácia do método, todo o estudo foi baseado nos aspectos anatômicos de órgãos vegetativos da aroeira da praia, através dos quais realizaram-se análises comparativas entre o seu cultivo em casa de vegetação e *in vitro* por organogênese direta.

1.1. HISTÓRICO DAS PLANTAS MEDICINAIS

É provável que a utilização das plantas como medicamento seja tão antiga quanto o próprio homem. Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada às práticas mágicas, místicas e ritualísticas. As plantas, por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, adquiriram fundamental importância na medicina popular (MARTINS et al., 2000). Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país, e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em residenciais (MACIEL et al., 2001).

Os médicos e herbaristas chineses, em 3700 a.C. documentavam tratados médicos, onde citavam curas com medicamentos naturais, sendo as plantas os mais utilizados. A primeira farmacopéia chinesa teria sido escrita entre 3700 a 2600 a.C., por Shen Nung, um sábio imperador (BORNHAUSEN, 1991). Atualmente a China mantém laboratórios de pesquisa e cientistas trabalhando exclusivamente para desenvolver produtos farmacêuticos com ervas medicinais de uso popular.

A China, a Índia e a Grécia, entre outros países importantes da antiguidade, destacaram-se pela dedicação e descoberta de misturas miraculosas com componentes vegetais para a cura de males físicos e espirituais (BERWICH, 1996). Sabe-se também que,

desde 2300 a.C., os egípcios, assírios e hebreus cultivaram diversas ervas e traziam de suas expedições tantas outras. Com estas plantas, chegavam a criar purgantes, vermífugos, diuréticos, cosméticos e especiarias para a cozinha, além de líquidos e gomas utilizados no embalsamento de múmias.

Na antiga Grécia, as plantas e o seu valor terapêutico ou tóxico eram muito conhecidos. Hipócrates (460-377 a.C.), denominado o “pai da medicina”, reuniu em sua obra *Corpus Hipocratium* a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado (MARTINS et al., 2000). A primeira referência ao uso de ervas medicinais na América é o Manuscrito Badanius, o herbário asteca, do século XVI.

No Brasil, apesar dos primeiros registros sobre plantas medicinais constarem como sendo dos Jesuítas, na verdade é da cultura indígena e africana o maior legado histórico, que através de seus componentes empíricos, as espécies mais importantes foram sendo selecionadas e incorporadas a um elenco de plantas eficazes na medicina popular (BERTOLUCCI et al., 2001). No século XX, entretanto, por ocasião da 2ª Guerra Mundial e com o advento dos antibióticos entre 1940 a 1950, houve um certo esquecimento da prática de ervas. Entre os anos de 1950 a 1970, houve uma grande divulgação conceituando os vegetais como ineficazes. A fitoterapia foi perdendo o seu crédito, enquanto os medicamentos sintéticos e as indústrias farmacêuticas ocupavam maior lugar de destaque. Com a consolidação dos medicamentos sintéticos houve uma busca exagerada dessas drogas, sendo criados novos produtos. Enquanto aumentava esse mercado, desenvolvia-se paralelamente uma nova patologia, ou seja, os efeitos colaterais provenientes do uso desses produtos, muitas vezes desnecessários (SIMÕES et al., 1995, citado por BERTOLUCCI et al., 2001). Consciente dos efeitos colaterais que os medicamentos sintéticos causavam ao organismo ressurgiu a prática dos medicamentos fitoterápicos e com ela todo o emprego de óleos e cosméticos naturais.

1.2 USO DAS PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. Entre os elementos que compõe a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além de seu uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido

como medicina tradicional. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matéria prima para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2001). Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Além disso, nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e acha-se em expansão o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (WHO, 2001).

Estima-se que no Brasil, 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (GUERRA e NODARI, 2001). Considera-se também que as vendas neste setor crescem 10% ao ano, com estimativa de terem alcançado a cifra de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (KNAPP, 2001). Estados Unidos e Alemanha estão entre os maiores consumidores dos produtos brasileiros. Entre 1994 e 1998, estes países importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de plantas que seguem para esses países sob o rótulo genérico de “material vegetal do Brasil”, de acordo com Ibama (REUTERS, 2002). Embora o nosso país possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas, apenas 8% foram estudadas para a pesquisa de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GUERRA e NODARI, 2001).

Neste sentido, compreende-se que o Brasil, com seu amplo patrimônio genético e sua diversidade cultural, tem em mãos a oportunidade para estabelecer um modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área de saúde e uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os

princípios étnicos e compromissos internacionais assumidos, notadamente a Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), e assim, promover a geração de riquezas com inclusão social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Entretanto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

É reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). Alguns laboratórios farmacêuticos brasileiros já produzem medicamentos fitoterápicos isto é remédios obtidos empregando-se exclusivamente matérias primas ativas de vegetais (Tabela 1), todos regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos.

Tabela 1. Alguns medicamentos fitoterápicos com suas marcas registradas.

Medicamentos fitoterápicos.	Espécies utilizadas para extração da matéria prima.	Indicação
Adprex®	<i>Hypericum perforatum</i> L.	Antidepressivo
Brefus®	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Antitussígeno
Endorus®	<i>Mentha piperita</i> L.	Antiespasmódico e antiinflamatório
Giamebil®	<i>Mentha cripa</i>	vermífuga
Gamax®	<i>Borago officinalis</i> L.	Redutor dos sintomas da tensão pré-menstrual (TPM)
Kronel® sabonete líquido	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Ação desodorizante, manutenção da acidez vaginal
Kronel® pomada ginecológica	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	Cicatrizante e antiinflamatório vaginal
Probeks®	<i>Aloe vera</i>	Creme dermatológico com ação cicatrizante

Fonte: Laboratório Hebron®, 2006.

1.3. CARACTERÍSTICAS BOTÂNICAS

A família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindale e compreende cerca de 70 a 80 gêneros com aproximadamente 600 espécies incluindo o gênero *Schinus*. Segue sua classificação taxonômica, segundo Ribas et al. (2006):



DIVISÃO: Tracheophyta

CLASSE: Magnoliopsida

ORDEM: Sapindales

FAMÍLIA: Anacardiaceae

GÊNERO: *Schinus*

ESPÉCIE: *Schinus terebinthifolius* Raddi

Figura 1. Ramos da aroeira. Fonte: Herbário UFRN.

As espécies da família Anacardiaceae apresentam uma distribuição predominantemente pantropical, com poucos registros nas regiões temperadas da Ásia, Europa e América do Norte. No Brasil ocorrem cerca de 13 gêneros e 68 espécies, com ampla distribuição de norte a sul (FERREIRA, 2000).

Essa família, incluindo o gênero *Schinus*, possui folhas inteiras ou compostas, de disposição alterna, sem espículas ou espículas decíduas. As flores são pequenas, não vistosas, brancas ou amarelo-esverdeadas, hermafroditas, ou de sexos separados, como no gênero *Schinus*, que apresenta plantas dióicas de simetria actinomorfa. São pentâmeras e o androceu formado por 10 estames ou menos. Apresenta ovário súpero, unicarpelar, unilocular com um só óvulo. O fruto é seco, do tipo noz ou baciforme e drupáceo. Pseudofruto às vezes desenvolvido (JOLY, 2002).

A espécie *S. terebinthifolius* é conhecida no nordeste brasileiro principalmente como aroeira, que é a abreviação de araroeira, ou árvore de arara, por ser esta a planta preferida por esta ave (BRAGA, 1967 citado por CARVALHO, 2000). Possui inúmeras denominações populares, tais como: aroeira-vermelha, aroeira da praia, aroeira pimenteira, aroeira do

Paraná, aroeira mansa. É encontrada facilmente em terrenos arenosos da Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, estendendo-se pelo cerrado até o Rio Grande do Sul, Argentina e Paraguai (TORRES, 1981). Esta variação nos nomes se dá, principalmente, pelo fato de seus frutos possuírem a aparência de uma pequena pimenta de coloração rosa-avermelhada, por isso, também chamados de pimenta-rosa (LENZI e ORTH, 2004)

A aroeira da praia é uma planta perenifólia, heliófita e pioneira, comum em beira de rios, córregos e em várzea úmidas de formações secundárias, contudo, cresce também em terrenos secos e pobres. É amplamente disseminada por pássaros, o que explica sua boa regeneração natural. É uma das espécies mais procuradas pela avifauna. Sua dispersão é ampla, ocorrendo desde a restinga até as florestas pluviais e semidecíduas.. Esta espécie atinge uma altura entre 5 e 10 m, com tronco revestido de casca grossa de 30 a 60 cm de diâmetro. As folhas compostas imparipenadas, fortemente aromáticas têm formato elíptico ou oval, de margens crenadas, denteadas e glabras. A floração geralmente ocorre nos meses de setembro a janeiro e suas flores são pequenas, dispostas em panículas, de coloração branco-esverdeadas e amarelo-pálidas e melíferas. Frutifica de janeiro a julho (BRAGA, 1967 citado por CARVALHO, 2000).

Sua madeira é moderadamente pesada, bastante resistente e de grande durabilidade natural, sendo utilizada para moirões, esteios, lenha e carvão (LORENZI, 2002). A casca do caule é de cor pardo acinzentado, com profundos sulcos longitudinais e transversais, muito rugosa, apresentando na superfície externa manchas irregular mais clara. Possui cheiro resinoso lembrando a terebentina e sabor adstringente. A face interna é estriada longitudinalmente, de cor pardo avermelhada e impregnada de matéria resinosa que aparece freqüentemente em sua superfície sob a forma de lágrimas (SILVA, 1926 citado por CARVALHO, 2000).

Pelo porte pequeno, é muito utilizada como uma árvore ornamental, indicada para a arborização de ruas e praças pela rusticidade e beleza de seus frutos (Figura 1 A e B), entretanto pode causar alergia a pessoas sensíveis que entram em contato com suas folhas.

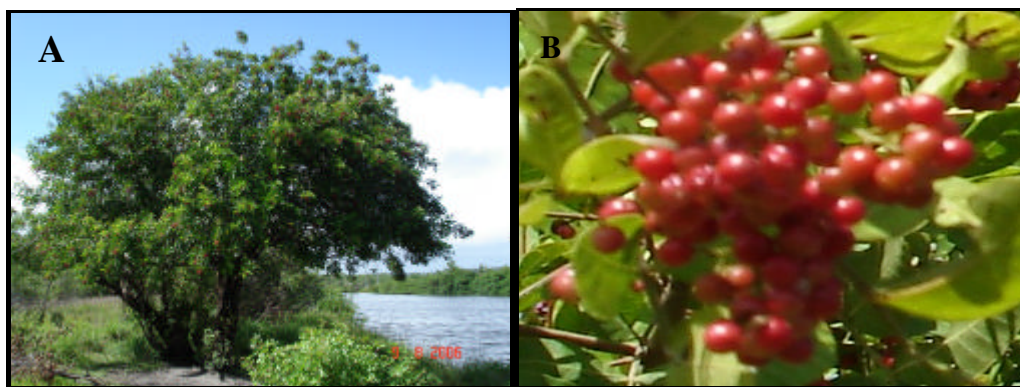


Figura 2. A: Aspecto geral da planta *Schinus terebinthifolius* Raddi no campo. B: Detalhe dos frutos. Foto: Paiva. Rio Ceará-Mirim (Extremoz, RN).

1.4. AROEIRA: USOS E IMPORTÂNCIA MEDICINAL

Estudos com representantes da família Anacardiaceae têm obtido avanços consideráveis e algumas espécies têm se destacado principalmente pela extração de substâncias usadas na indústria e na medicina popular (FERREIRA, 2000).

1.4.1 Uso comercial

Culinária:

A aroeira, atualmente, vem se destacando cada vez mais pelo consumo de seus frutos (pimenta-rosa), cuja demanda tem aumentado muito, tanto no mercado nacional como no internacional, que os utiliza como condimento alimentar. Na atualidade, a exploração de seus frutos se restringe à coleta manual em populações naturais, presentes principalmente em áreas de restinga do litoral brasileiro (LENZI e ORTH, 2004).

Segundo Bornhausen (1991), essa espécie pode ser utilizada tanto na culinária, onde seu fruto encontra-se entre as muitas especiarias existentes e são utilizados basicamente para dar sabor e refinamento aos pratos da culinária mundial. O sabor suave, levemente picante permite o seu emprego em diversas preparações, podendo ser utilizada na forma de grãos inteiros ou moídos. A aroeira é também utilizada na arborização urbana com uso decorativo, porém a sua principal importância reside na sua extensa utilização medicinal.

Alimentação para animais:

Segundo Baggio (1998), a aroeira pode ser utilizada como forragem, usada principalmente para a alimentação de caprinos como suprimento alimentar, esses animais comem avidamente as folhas e brotos desta espécie.

Madeira:

A madeira da aroeira é resistente, podendo ser utilizada como esteios e mourões, devido à sua durabilidade prolongada (SANCHOTENE,1985). A lenha desta espécie é de boa qualidade, sendo muito procurada no meio rural. Segundo o Instituto de pesquisas e estudos florestais 2006 (IPEF), produz carvão de boa qualidade e é muito utilizada na construção civil. A casca é rica em tanino sendo utilizada em curtume para fortalecer redes de pescas.

1.4.2 Importância medicinal

A aroeira da praia possui inúmeras potencialidades medicinais e fitoquímicas. Alguns de seus metabólicos secundários têm auxiliado no tratamento e cura de diversos males. As partes que apresentam propriedades fitoterápicas são a casca e a folha, consideradas pela medicina popular como adstringentes, antidiarréica, antiinflamatórias, depurativas, diuréticas e febrífugas. Devido à composição de seus óleos essenciais, é usada no tratamento de distúrbios respiratórios. É também empregada no tratamento de inflamações e infecções uterinas. Da casca, extrai-se o óleo empregado contra tumores e doenças da córnea (MATOS, 2002).

De acordo com a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FUNCAP (1999) a aroeira possui crescente uso farmacológico devido à casca do caule (entrecasca) ser utilizada como antiinflamatório (especialmente no pós-parto).

Para Chung et al. (1998), as atividades farmacológicas dessa planta, podem ser atribuídas à diversidade de constituintes químicos desse vegetal, tais como os taninos e os polifenóis que se caracterizam farmacologicamente pelas propriedades adstringentes, anti-sépticas e hemostáticas. Quanto à composição química, estudos realizados por Medeiros (2001) revelam a presença de taninos, saponinas, esteróides e triterpenóides como os principais constituintes da casca de *Schinus terebinthifolius*.

Dos constituintes químicos da *Schinus terebinthifolius*, os taninos são os mais estudados, devido às atividades biológicas comprovadas por diversos pesquisadores. Trabalhos realizados com várias espécies de plantas ricas em taninos têm mostrado que estes apresentam atividades anticarcinogênica, antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante (RUFFA et al., 2002).

Segundo Amorim (2003), a espécie *S. terebinthifolius* tem o uso amplamente difundido para o tratamento de diversas infecções. O decocto da casca tem sido tradicionalmente utilizado pelas mulheres nordestinas para tratar de cervicites e corrimentos

genitais. Na experiência pessoal de vários ginecologistas, é raro encontrarem cervicites ou colpites em mulheres que tenham feito uso dessa planta.

1.5 PROPAGAÇÃO DA AROEIRA

Dentro de sua amplitude ambiental, a espécie apresenta distintas formas de crescimento, com ecótipos de porte variando desde pequenos arbustos (50 a 60 cm em altura) até árvores com 15 metros e diâmetros de 50 a 60 cm (REITZ et al., 1983 citado por BAGGIO, 1998). Ocorre em diversos tipos de solos, de baixa fertilidade natural a férteis e tanto em solos úmidos ou secos, arenosos a argilosos.

A propagação dá-se por sementes e, certamente, por estaquia a partir de segmentos da do caule. O crescimento é relativamente rápido, podendo atingir 1,0 m de altura no primeiro ano (SANCHOTENE, 1985). Em experimento implantado em Irati-PR, ela atingiu 3,25 m em altura média aos cinco anos de idade, com alta sobrevivência (93,8%). No entanto, em Paranaguá-PR, o autor registrou crescimento superior, atingindo, já no primeiro ano de idade, a altura média de 3,31 metros, com 90,5% de sobrevivência. Em experimento implantado em Dois Vizinhos, sudoeste paranaense, (SILVA e REICHMANN, 1990) obtiveram entre 7,9 m e 8,9 m de altura média aos 10 anos de idade, com 100% de sobrevivência.

A figura 2 mostra um exemplo de propagação por estaquia da aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi com um ano de idade já apresentando floração.



Figura 2. *Schinus terebinthifolius* Raddi A: obtida a partir de propagação por estaquia (seta). B: com um ano de idade, apresentando flores (seta). Foto: Paiva. Área anexa à casa de vegetação (UFRN, Centro de biociências).

1.6 CULTURA DE TECIDOS

A técnica de cultura de células, tecidos e órgãos vegetais aumentou muito nos últimos anos, gerando um largo alcance na variação genética em espécies de plantas que pode ser incorporada em programas de seleção *in vitro* com características agronômicas úteis. A cultura baseia-se na totipotência da célula vegetal devido a sua capacidade de originar células e iniciar um novo indivíduo multicelular (DUCAN, 1997). Segundo Torres (1998) as técnicas de cultura de tecidos têm sido empregada de diferentes formas para o desenvolvimento de cultivares superiores de plantas. Em geral essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não, necessariamente, no desenvolvimento direto de novos cultivares. Mas podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e muitas vezes, oferecem soluções únicas.

Com a extensa utilização da cultura de tecidos em melhoramento de plantas com resistência a herbicidas, insetos e patógenos essa cultura vem sendo bastante empregada na preservação de espécies ameaçadas de extinção onde entre essas espécies muitas possui propriedades medicinais. Segundo Medeiros (2003) o fantasma da extinção de espécies biológicas torna-se cada vez mais ameaçador, o Brasil é considerado o país que apresenta a maior biodiversidade genética vegetal do mundo com cerca de 55.000 espécies catalogadas. E como em outras partes do planeta, no Brasil também, a expansão agrícola e a urbanização, com a conseqüente eliminação do habitat, são as principais causas da elevação nas taxas de extinção.

A importância da cultura de tecidos em plantas medicinais vem sendo comprovada através de estudos das plantas e de suas partes, cujo valor medicinal tenha sido confirmado pelas pesquisas. Segundo Amaral e Silva (2003) para se ter uma produção confiável de drogas terapêuticas como uma espécie recentemente adaptada às práticas de cultivo, faz-se necessário acompanhar esse cultivo; sendo que, tratando-se de plantas anuais, o tempo para o seu cultivo leva de 3 a 5 anos, enquanto que se tratar de plantas perenes, de 10 a 12 anos. Em geral, dos princípios ativos aos medicamentos são gastos cerca de 10 a 15 anos na elucidação química, testes pré-clínicos e clínicos. Reconhecendo-se que uma planta produza 10g de massa seca e que nessas 10g se obtenha 0,3g da droga isolada e que sejam necessários, para atender mercado, 30kg dessa substância, então será preciso 100.000 plantas só nesse primeiro momento, o que se torna extremamente dispendioso. Diante desse problema as técnicas de cultura de tecidos, como a micropropagação, são de grande importância, pois as sucessivas divisões celulares de partes da planta, em meio de cultura aceleram a propagação. A

micropropagação possibilita obter-se um número de brotos ilimitado, acelerando a produção de plantas exatamente iguais a um determinado genótipo selecionado no campo por suas boas características. Com isso não seria mais necessário à retirada desse material da natureza e ao mesmo tempo poderia avançar na pesquisa de princípios ativos de material vegetal em grande quantidade preservando o meio ambiente.

1.6.1 Micropropagação

A micropropagação é assim chamada por causa do tamanho dos propágulos utilizados é a aplicação mais prática da cultura de tecidos sendo, também, denominada de propagação vegetativa *in vitro*. Hoje, essa é uma atividade comercial que se concentra principalmente na limpeza clonal e na multiplicação de espécies ornamentais herbáceas e arbustivas. Logo em seguida vêm as plantas lenhosas que são consideradas espécies de difícil reprodução, (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Essa técnica permite a produção de um grande número de plantas através de pequenas porções do tecido da planta em um período relativamente curto. A cultura de tecidos refere-se à manutenção e a propagação das partes de plantas em ambiente controlado e livre de microrganismos. O melhoramento genético inclui a manipulação de germoplasma, seleção e estabilização de genótipos, teste de variedade, proteção e estágios de produção (PAULS, 1995).

A utilização de fitorreguladores é imprescindível para que se possa obter sucesso na propagação da cultura *in vitro* (SCHWENGBER et al., 1999). Para Pierik (1990), um adequado balanço entre auxinas e citocininas estabelece um eficiente controle no crescimento e na diferenciação das culturas *in vitro*. O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). O estado fisiológico da planta, de onde são retirados os explantes, tem grande influência no posterior comportamento das culturas. Devendo levar em consideração o estado nutricional da planta, pois plantas bem nutridas fornecem bons explantes. A retirada de explante deve ser feita de preferência a partir de brotações mais novas que são formadas durante a fase ativa de crescimento da planta onde o tamanho do explante também determina suas possibilidades de sobrevivência e capacidade de crescimento (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Torres (1998) descreveu um esquema padrão para sistema de micropropagação que foi apresentado por Murashige (1974) onde se divide em três estágios: estágio I – seleção de explantes, desinfestação e cultura do meio nutritivo sob condições assépticas; estágio II – multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para a multiplicação; estágio III – transferência das partes aéreas produzidas para o meio de enraizamento e subsequente transplante das plantas obtidas para o substrato ou solo. Este esquema permite alterações conforme a peculiaridade da espécie e deve-se ter sempre claro que a micropropagação mantém a herança do genótipo propagado, não introduzindo nenhuma variabilidade genética.

A formação de raízes adventícias nas partes aéreas obtidas, no estágio de multiplicação, permite a constituição de plantas completas, para posterior transferência a condições *ex vitro*. Muitas vezes, as raízes formadas não apresentam características adequadas às funções de absorção, determinando, dentre outros fatores, a morte das mudas, quando transferidas para o solo. O processo de enraizamento é muito complexo, incluindo fatores fisiológicos, bioquímicos e biológicos (fatores internos) que interagem com os fatores externos. (ASSIS e TEIXEIRA, 1998).

Embora existam espécies que formam raízes adventícias apenas com os níveis endógenos de auxina, geralmente é necessário adicionar auxina exógena para estimular a rizogênese. Tipos e concentrações de auxinas são as variáveis que mais influenciam no enraizamento as mais utilizadas são o AIB, ANA e o AIA (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O período de transição da fase *in vitro* para a *ex vitro*, conhecida como período de aclimação, é uma das etapas mais importantes no processo de obtenção de plantas pela técnica de cultura de tecidos (PREECE e SUTTER, 1991). Durante a aclimação, as plantas são transferidas de um ambiente controlado para um ambiente não controlado, onde elas têm que reequilibrar suas atividades fisiológicas, dentre as quais a absorção de água e nutrientes e a atividade fotossintética (DESJARDINS et al., 1987). Essa fase de transição predispõe as plantas a um desequilíbrio hídrico e nutricional, decorrente de limitações de natureza anatômica e fisiológica, características das plantas micropropagadas. Tais limitações incluem cutícula pouco espessa, estômatos não funcionais, nutrição heterotrófica e sistema radicular pouco desenvolvido (AZCÓN-AGUILAR e BAREA, 1997).

A aclimação inadequada das plantas micropropagadas pode resultar, por essas razões, numa alta porcentagem de mortalidade. É imprescindível que as modificações do ambiente durante a aclimação das plantas micropropagadas sejam conduzidas de forma controlada e contínua, possibilitando um ajuste gradativo das mesmas às novas condições.

1.6.2 Organogênese

A regeneração ou morfogênese *in vitro* é o processo de formação de órgãos a partir de outros pré-existentes, podendo ocorrer através da embriogênese somática ou organogênese direta e indireta. Na morfogênese, através do processo de organogênese, tecidos vegetais se diferenciam em meristemas caulinares e/ou radiculares que originam caules ou raízes, respectivamente. Quando a formação de órgãos é decorrente diretamente de tecido do explante, ou de pequena proliferação do mesmo denomina-se organogênese direta (BRANDÃO et al., 2005). A organogênese direta é o sistema mais adequado para obtenção de mudas uniformes, tornando possível a propagação com rapidez de clones desejáveis de várias espécies tanto lenhosas como frutíferas, pois, segundo Tzifira et al. (1997) evita a formação de escapes gênicos e diminui a possibilidade de ocorrer variação somaclonal. O maior sucesso de protocolos de organogênese direta *in vitro* é a utilização de tecidos jovens, que possuem maior competência organogênica (TAMURA et al., 1992).

Diferenças significativas na capacidade organogenética *in vitro* são encontradas ao se variar a composição mineral, as vitaminas e as fontes de açúcares dos meios de cultura. Concentrações de reguladores de crescimento no meio de cultura são críticos para o meio de controle de crescimento e morfogênese. Uma baixa concentração de auxina com alta concentração de citocinina no meio resulta na indução de brotos morfogenéticos. A auxina sozinha ou com baixíssima concentração de citocinina é importante para indução de raízes primárias (FLICK et al., 1986)

1.6.3 Oxidação Fenólica

As plantas perenes lenhosas são consideradas ricas em substâncias derivadas do metabolismo secundário como os polifenóis, os quais exercem importante papel no metabolismo destas espécies, bem como na defesa contra predadores e microrganismos. A oxidação fenólica *in vitro* constitui um dos principais problemas enfrentados no início do estabelecimento e durante o cultivo de explantes dessas espécies, sendo altamente dependente do genótipo. Alguns gêneros de plantas são mais susceptíveis à oxidação fenólica que outros,

dependendo do tipo de explante utilizado. Os explantes jovens apresentam menos problemas de oxidação que os explantes adultos (TEXEIRA, 2006).

A oxidação fenólica se dá por meio de uma enzima chamada de polifenol oxidase, que contém íons cobre para sua ativação e está presente nos plastídios. Esses compostos fenólicos *in vitro*, são percussores da síntese de lignina, pelo tecido injuriado ou senescentes de essência nativas, especialmente das tropicais, que contém alta concentração desses componentes (GEORGE e SHERRINGTON, 1984), esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, inibindo o crescimento dos explantes, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998). Preece e Sutter (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura para algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo fenóis, flavanóides e taninos, os responsáveis pela oxidação.

A adição de compostos antioxidantes no meio de cultura pode contribuir para minimizar o problema da oxidação dos explantes como, por exemplo, carvão ativo que apresenta cargas residuais, as quais são capazes de adsorver substâncias fenólicas ou seus produtos da oxidação, as quinonas. O uso de carvão ativo, contudo, pode adsorver outras substâncias do meio nutritivo como os reguladores de crescimento, acarretando efeitos indesejáveis ao cultivo. Uma alternativa para esses casos é ajustar a concentração de reguladores de crescimento de tal forma a se obter o efeito desejado. Outro antioxidante bastante utilizado em meios de cultura é o polivinilpirrolidone (PVP) uma poliamida utilizada em cromatografia de separação de ácidos aromáticos, aldeídos e fenóis pela sua função absorvente. Os fenóis são adsorvidos pelo PVP por meio de ligações de hidrogênio, o que previne a oxidação e polimerização, além de adsorver os produtos da oxidação fenólica. O ácido ascórbico adicionado ao meio de cultura também pode prevenir a oxidação (TEXEIRA, 2006).

Além da adição de compostos antioxidantes no meio de cultura, a remoção de substâncias fenólicas podem ser feitas através da lavagem dos explantes em água corrente, transferência do explante para meios frescos ou mesmo a mudança de lugar do mesmo dentro do frasco de cultura, utilização de meio líquido e modificação do ambiente com cultivo no escuro ou em baixa intensidade luminosa (TEXEIRA, 2006).

1.7 MORFOLOGIA E ANATOMIA VEGETAL

A anatomia vegetal é o ramo da botânica que estuda a estrutura interna dos organismos vegetais. Seu estudo se resume ao exame detalhado de cada uma das partes ou órgãos, considerando sua posição no corpo vegetal, tem-se a anatomia descritiva. Quando a anatomia

não se limita a estudar órgãos já adultos, mas acompanha seu desenvolvimento desde o início da sua formação até a fase adulta, tem-se a anatomia ontogenética. O estudo da estrutura das partes e órgãos vegetais, levando em conta a função que desempenham, denomina-se anatomia fisiológica (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2003).

A maioria das plantas vasculares consiste de um número de diferentes órgãos: raiz, caule, folha e flor, e cada um desses, por sua vez, é formado por um número diferente de tecidos. O estudo das estruturas internas dessas várias partes da planta é conhecido como anatomia vegetal e começou há pouco mais de 300 anos atrás, com trabalho de Grew e Malpighi. Seus trabalhos envolveram descrições cuidadosas e bem ilustradas de material vegetal. Grew defendia, já naquela época, a tese de que a anatomia vegetal deveria incorporar estudos comparativos sazonais e de desenvolvimento da planta inteira. Recentemente, foi apontado que a anatomia de poucas espécies é conhecida detalhadamente. É evidente uma necessidade de maior comunicação internacional e cooperação neste campo científico, pois e que em qualquer pesquisa botânica encontram-se aspectos relevantes à anatomia. A anatomia vegetal comparativa também tem várias aplicações além do campo da botânica ortodoxa; como farmacognosia, medicina forense e arqueologia (CUTTER, 1986).

O estudo da estrutura interna dos vegetais pode auxiliar na compreensão de vários fenômenos relacionados ao corpo do vegetal, bem como nos estudos de identificação taxonômica. As respostas morfogenéticas de organogênese e embriogênese, obtidas na cultura de tecidos e células vegetais *in vitro*, têm sido confirmadas mediante análise anatômica, além disso, as substâncias reguladoras de crescimento utilizadas nessas práticas interferem na formação das células e tecidos (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2003). Uma das dificuldades de sucesso da propagação vegetativa através da micropropagação é a transferência das plantas de um local com condições controladas para casas de vegetação ou outras áreas. Esse processo tem relação com as características estruturais. A identificação dos aspectos estruturais é importante para o sucesso da propagação, a qual depende da regeneração de tecidos vegetais (SILVA et al., 2005)

Referências

- ABREU, I.N. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, . p.101, 1998 .
- AMARAL, C.L.F; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biociência** n.30, p.55-59, 2003.
- AMORIM, M. M. R. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia** , v.25, n.2, p. 95-102, 2003.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Universidade Federal Viçosa: UFV, v.1, 2003,p.438.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-296.
- AZSCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.1-24, 1997.
- BAGGIO J. A. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade Rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 17, p.25-32, 1988.
- BERTOLUCCI, S. K. V. ; CAPPELLE, E. R.; PINHEIRO, R. C. **Manipulação de fitoterápicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, p.206, 2001.
- BERWICK, A. **Aromaterapia holística**. Rio de Janeiro: Record, 1996. 270p.
- BORNHAUSEN, R. L. **As ervas do sítio; história, magia, saúde, culinária e cosmética**. São Paulo: M.A.S. p. 207, 1991.

BRANDÃO, L. R.; GONÇALVES, M. C. C.; PETRILLO, C. P.; COELHO, G. T. C. P.; SCHARFFERT, R.E. **Circular técnica**. n. 59 p.1-6, 2005.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**. v.21, n.1.234, p.26-30, 1997.

CALIXTO, J.B. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v.2, p. 261-279, 2001.

CARVALHO, M. C. R. D.; Avaliação da mutagenicidade do decocto das cascas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Dissertação de mestrado**, Universidade federal do Rio Grande do Norte. p. 94, 2000.

COSTA, N.P. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Lavras. p.61, 1995.

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. v.1 Rocca p.300, 1986.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannis and human health: A review. Critical reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 421-464 1998.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of ex vitro strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.846-851, 1987.

DUCAN ,R.R. **Tissue culture-induced variation and crop improvement**. Advances in agronomy, v.58 copyright p. 201, 1997.

FERREIRA, A. Z. S. Propriedades e aplicações curativas da “aroeira-do-sertão” (*Myracrodruon urundeuva* Allemão – Anacardiaceae), na zona rural no município de caririçu, Ceará Brasil. **Monografia de especialização**, Universidade regional da cariri, p.40, 2000.

FUNCAP Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Validação científica das plantas medicinais 1999.** Disponível em: <<<http://www.funcao.ce.gov.br>>. Acesso em 10 jan. 2005.

FLICK, C. E.; EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; **Basic techniques of plant cell culture.** Cap,2 p15-81.1986.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories.** Everley: Exegetics, p.709, 1984.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** porto Alegre: UFRGS; p.15, 2001.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p.182-260, 1998.

IPEF Instituto de pesquisa e estudo florestais. **Identificação de espécies florestais.** Disponível e, :<<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=30> - 23k. Acesso em 15 jan. 2006.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 13°. ed. São Paulo: Nacional, 2002.

KANAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta mercantil.** n. 22170, Setembro, 2001.

LENZI, M.; ORTH A.I. Caracterização Funcional do sistema Reprodutivo da Aroeira vermelha (*Schinus Terebinthifolius* Raddi), Florianópolis-Sc, Brasil **Revista. Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 198-201, Agosto 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa. Plantarum.p.20, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; Plantas Medicinais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, 2001.

MARTINS, E.R; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**, Viçosa:Universidade Federal Viçosa,. P. 220, 2000.

MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4 ed. Fortaleza UFC,. p 257, 2002.

MEDEIROS, M.G.F. Influência dos adjuvantes tecnológicos na qualidade dos extratos secos atomizados da *Schinus terebinthifolius* Raddi “Aroeira da praia” (Anacardiaceae). 2001. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Programa de pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRN, Natal, P.129, 2001.

MEDEIROS, J.D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Biotecnologia e desenvolvimento**, n.30, p.109-113, 2003.

MIGLIATO, K. F. Estudo farmacognóstico otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. **Dissertação de mestrado**. Universidade estadual paulista-SP. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterapicos**. Departamento de ciência farmacêutica, v.1, p.59, 2006.

PAULS, K.P. Plant Biotechnology for crop Improvement. **Biotechnology Advances. S.I.**, v.13, n.4, p.673-693, 1995.

PIERIK, R.L.M. Preparación y coposición de los medios nutritivos. In : **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madri, Ediciones Mundi Prensa, p.49-84, 1990.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERG, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer **Academic Press**, p. 71-93, 1991.

REUTERS. Brasil terá primeiro banco de dados de plantas medicinais. Folha on line, Brasil, 2002. Disponível em: <http://ww.uol.com.br/folha/reuters/ult112ul12329.shl>. Acesso: 12 set. 2006.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** v.39, p.603-, 2001.

TAMURA, M. et al. Highly stable regeneration from long term cultures of Japanese persimmon callus. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 148. 1992.

p.554-561, 1997.

RUFFA, M. J.; et al. Cytotoxic effect of Argentine medicinal carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.335-339, 2002.

SANCHOTENE, M.M.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre, Feplam. P.311, 1985.

SILVA, L.B.X.; REICHMANN NETO, F. Avaliação comparativa de desenvolvimento de 26 espécies florestais, em plantios homogêneos, no sudoeste paranaense. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. v.3, p. 649-657. Publicado na Silvicultura, n.42, 1990.

SCHWENGBER, J.E.; RODRIGUES, A .C; RUFATO, L.; FORTES, G.R.L. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação da microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 21, n.2, p.200-203. 1999.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: <<http://www.redbio.org/.../simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira>>. Acesso em 15 jan. 2006.

TORRES, D. M. G. **Catálogo de plantas medicinais (y alimentícias y utiles) usados em paraguay**. Asunción, p. 121-129, 1981.

TORRES, A.C.; CALDAS,L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.2. Brasília: EMBRAPA, 21p, 1998.

TZFIRA, T.; JENSEN, C. S.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.99, TUROLLA, M. S.R.; NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira Ciência Farmacológica**. v.42, n.2 , 2006.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneve, v.1, 2001.

2. OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1. OBJETIVO GERAL

- Estabelecer protocolos de obtenção de brotos múltiplos *in vitro* de aroeira *S. terebinthifolius* Raddi por organogênese direta e estudo anatômico comparativo das espécies desenvolvidas *in vitro* e *ex vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações hormonais de 6-Benzilaminoburina (BAP) apropriadas para a obtenção de um número de brotos satisfatório.
- Avaliar o efeito do ácido ascórbico, carvão ativado e polivinilpirrolidone (PVP) no combate da oxidação polifenólica.
- Caracterização da anatomia foliar, caulinar e radicular de plantas de *S. terebinthifolius* cultivada *in vitro* e *ex vitro*.



CAPÍTULO 2

ARTIGO 1**TÍTULO**

Regeneração direta *in vitro* de aroeira da praia em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina

AUTORES

Alessandra Maria de Sousa Paiva e Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa

Regeneração direta *in vitro* de aroeira da praia em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina

Resumo – A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma Anacardiaceae extensivamente utilizada por suas propriedades medicinais. O objetivo desse estudo foi estabelecer concentrações ideais de 6-Benzilaminopurina (BAP) para a micropropagação de *Schinus terebinthifolius* através da regeneração direta *in vitro* de segmentos nodais, internodais, cotiledonares e ápices caulinares. Os explantes foram cultivados em meio MS, suplementado com 3% de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol e concentrações distintas de BAP: 0; 2,25; 4,5; 9,0; 18,0 µM. Os parâmetros avaliados foram a indução de brotos, número e comprimento dos brotos. Foi observado que, para o estabelecimento *in vitro* da aroeira da praia, o explante mais indicado é o segmento nodal. Os segmentos internodais desenvolvem apenas calos, não havendo indução de brotos adventícios. O tratamento com 4,5 µM de BAP é o mais responsivo para a regeneração de *Schinus terebinthifolius*. O tratamento inicial com o BAP continua influenciando positivamente no crescimento dos brotos mesmo durante a posterior fase de alongamento.

Termos para indexação: *Schinus terebinthifolius*, Planta medicinal, Micropropagação.

***In vitro* direct regeneration of aroeira da praia in different concentrations of 6-benzilaminopurine**

Abstract – The aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) is an Anacardiaceae extensively used due to your medicinal proprieties. The objective of this work was to establish ideal concentrations of 6-Benzilaminopurine for the *Schinus terebinthifolius* micropropagation through the direct organogenesis of nodal, internodal, cotyledonar and apical segments. The explants were cultivated on MS medium supplemented with 3% of sucrose, 0.1 g.L⁻¹ of mio-inositol and distinct concentrations of BAP: 0, 2.25, 4.5, 9.0 and 18.0 µM. The parameters evaluated were the induction of shoots, the number and length of shoots. Nodal segment is the more suitable explant for the *in vitro* establishment of aroeira da praia. The internodal segment developed callus only and its does not present induction of shoots. The treatment with 4.5 µM de BAP was the most responsive. The initial treatment with the BAP influenced positively in the subsequent elongation phase.

Index terms: *Schinus terebinthifolius*, Medicinal plants, Micropropagation.

Introdução

A exploração extrativista de diversas espécies de plantas com propriedades medicinais vem provocando erosão genética e colocando-as em risco de extinção. A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários pesquisadores e incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando a coleta de plantas saudáveis (SABÁ et al., 2002).

Schinus terebinthifolius Raddi, conhecida popularmente como aroeira da praia, aroeira vermelha, aroeira pimenteira e aroeira mansa, é uma Anacardiaceae encontrada em terrenos arenosos da Mata Atlântica do Nordeste do Brasil, estendendo-se pelo cerrado até o Rio Grande do Sul, Argentina e Paraguai (TORRES, 1981). Esta espécie possui um crescente uso farmacológico; é considerada pela medicina popular como adstringente, antidiarréica, antiinflamatória, depurativa, diurética e febrífuga. A casca e as folhas são as partes que apresentam utilização fitoterápica, sendo suas propriedades atribuídas à diversidade de constituintes químicos deste vegetal, tais como os taninos e os polifenóis (MATOS, 2002).

Considerando a sua utilização medicinal, sendo o extrato da casca amplamente utilizado pela indústria farmacêutica, ainda são poucos os estudos sobre a propagação desta espécie. As técnicas de micropropagação seriam uma alternativa viável, pois, a clonagem de mudas individuais promove plantas com material genético uniforme, o que seria uma fonte satisfatória para procedimentos industriais de extração de combinações de interesse. Segundo Oliveira (2003), a utilização de material geneticamente uniforme, seria viável para se obter protocolos para extração de princípios ativos podendo esses ser unificados.

O tipo de citocinina e a sua concentração são os fatores que mais influenciam o sucesso da multiplicação *in vitro*. A 6-benzilaminopurina (BAP) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação de diversas espécies e parece ser a citocinina por excelência para multiplicação de partes aéreas e indução de gemas adventícias. Isso parece ocorrer por razão dos tecidos vegetais responderem aos hormônios naturais mais rapidamente do que aos reguladores de crescimento sintéticos (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

Na literatura, existe uma série de trabalhos sobre a propagação *in vitro* de diversas espécies da família Anacardiaceae, porém algumas são negligenciadas, a exemplo de aroeira da praia, *S. terebinthifolius* Raddi. Sendo assim, este trabalho objetivou desenvolver um protocolo para regeneração direta de brotos em *Schinus terebinthifolius* Raddi. O estudo é parte do processo de micropropagação, que possibilitará homogeneidade na produção de mudas com características genéticas de interesse e qualidade fitossanitária, mudas essas, que

poderão ser utilizadas pela indústria farmacêutica para extração do princípio ativo, evitando a exploração extrativista.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no período de Janeiro a Julho de 2006. Os frutos foram coletados de espécimes de *Schinus terebinthifolius* Raddi encontrados no rio Ceará-Mirim, município de Extremoz/RN (Apêndice 1).

As sementes foram germinadas em condições de casa de vegetação, em sacos com capacidade para um litro, em diferentes tipos de substrato: vermiculita, húmus, argila e areia com percentual de germinação de 20%, 52%, 20% e 30% respectivamente. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições de 10 unidades sendo cada unidade com 3 sementes por substrato. Após quatro meses de germinação as plantas foram transferidas para baldes com capacidade de oito litros contendo areia e húmus na proporção de 1:1.

Ramos jovens de aroeira com aproximadamente 15 cm de comprimento, foram coletados de plantas com 4 a 8 meses de idade, cultivadas em casa de vegetação (Apêndice 2). Após remoção das folhas, os ramos foram desinfestados em câmara de fluxo laminar, através da imersão em etanol a 70%, por 3 minutos, e em solução de hipoclorito de sódio a 2%, por 15 minutos. Após a desinfestação, os mesmos foram lavados 3 vezes com água destilada autoclavada, por 10 minutos cada, para posterior retirada dos explantes.

Os explantes utilizados foram segmentos cotiledonares (5 x 5 mm), segmentos nodais com um único nó (10 mm), segmentos internodais (10 mm), e ápices caulinares (10 mm). Os explantes foram colocados individualmente em frascos de 100 ml de capacidade contendo 30 ml de meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol, 6,0 g.L⁻¹ de ágar e concentrações distintas de 6- Benzilaminopurina (BAP): 0,0 µM, T0; 2,25 µM, T1; 4,5 µM, T2; 9 µM, T3; e 18 µM, T4. O pH foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem, realizada a 121°C por 20 minutos. As culturas foram mantidas no escuro por 7 dias, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, e depois transferidas para fotoperíodo de 12 horas, com intensidade luminosa de 27 µmol.m⁻².s⁻¹ a mesma temperatura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) não balanceado, com 3 repetições de 10 unidades experimentais, totalizando 30 explantes para

cada tratamento. Os parâmetros taxa de indução de brotos, número e altura dos brotos, foram avaliados ao fim de 45 dias de cultivo *in vitro*. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os brotos obtidos foram colocados em meio para alongamento composto de sais e vitaminas de MS, adicionado de 3% de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol e 2,88 µM de ácido giberélico (GA₃). Aos 30 dias após a inoculação, avaliou-se o crescimento médio dos brotos. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) balanceado. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e Discussão

Segmentos cotiledonares e ápices caulinares apresentaram alto nível de oxidação fenólica, impedindo o prosseguimento das culturas, concordando com Das et al (1996) que observaram o escurecimento e morte dos explantes após 15-20 dias de cultivo provenientes de cajueiros cultivados em casa de vegetação. A oxidação fenólica é um dos problemas que dificultam o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, ocorrendo a liberação de compostos fenólicos devido a injúria causada nos tecidos durante a excisão dos explantes. Algumas enzimas oxidam os fenóis formando quinonas, que são responsáveis pela coloração marrom das culturas, além de causarem a inibição do crescimento e morte dos explantes em grande número de espécies (FLORES et al., 1998).

Aos 7 dias após a inoculação verificou-se o início de calogênese nos segmentos nodais em regiões próximas ao nó, enquanto o aparecimento de brotos é observado a partir do décimo quinto dia de cultivo *in vitro*. Foi verificado por Carvalho et al. (2002) a indução de brotos a partir de segmentos nodais de cajazeira, *Spondias mombin* L., após duas semanas de cultivo em meio WPM (LLOYD e Mc COWN, 1980) com diferentes concentrações de BAP. Ao contrário do observado para segmentos nodais, os segmentos internodais desenvolveram apenas calos, não havendo indução de brotos adventícios. De acordo com o observado, apenas o segmento nodal mostrou-se viável e responsivo para regeneração *in vitro* de *S. terebinthifolius* Raddi.

Os explantes submetidos ao tratamento T2 (4,5 µM de BAP) apresentaram a maior taxa de indução de brotos (86,6%) (Figura 1). Resultados similares foram obtidos por Andrade et al. (2000), que, ao trabalharem com aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.), alcançaram as maiores taxas de regeneração (90%) na concentração de 4,5 µM de BAP. Os tratamentos com T0 e T1 apresentaram taxa de indução de brotos significativamente iguais, enquanto que os tratamentos T3 e T4, foram ineficientes para obtenção de brotos,

causando apenas o aparecimento de calos. Boggetti et al. (1999), estudando a morfogênese de caju (*Anacardium occidentale* L.), também verificaram a formação de calos em explantes cultivados em meio nutritivo com 20 μM de BAP. Mneney e Mantell (2002) relatam que concentrações de BAP acima de 20 μM suprimiram a formação de brotos a partir de segmentos nodais de caju.

Os tratamentos T1 (2,25 μM de BAP) e T2 (4,5 μM de BAP), diferenciaram, em média, 2 brotos por explante, diferindo significativamente do tratamento sem regulador de crescimento (Figura 2 e 3). Os resultados observados para a regeneração de *S. terebinthifolius* Raddi são significativos quando comparados à trabalhos anteriores realizados com plantas aparentadas. Andrade et al. (2000), obtiveram a regeneração de apenas um broto de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por segmento nodal, utilizando um meio suplementado com 2,3 μM e 4,5 μM de BAP. Sabá et al. (2002), trabalhando com a micropropagação do jaborandi, obtiveram 1,8 brotos por explante na concentração de 6,66 μM de BAP. Entretanto Das et al. (1996) observaram a formação de 10-12 brotos de *A. occidentale* L. por explante em meio MS com 4,4 μM de BAP, 2,32 μM de CIN e 9,12 μM de ZEA. Esse fato mostra que a proliferação de brotos *in vitro* pode ser maximizada com o emprego de dois ou mais reguladores de crescimento. Talvez a proliferação de um número maior de brotos de *S. terebinthifolius* Raddi necessite da combinação entre mais de uma citocinina, ou de citocininas com auxinas.

Aos 45 dias de cultivo não foi verificada diferença significativa no comprimento dos brotos entre os tratamentos T1 e T2, com médias de 2,15 cm e 3,45 cm, respectivamente. No entanto, o tratamento T2 induziu brotos com comprimentos médios significativamente maiores que o T0 (Figura 4). Concordando com esse resultado observado, Andrade et al (2000) obtiveram os maiores brotos de *M. urundeuva* Fr. All. em tratamento com 4,5 μM . de BAP.

Os brotos originários da fase de regeneração foram todos tratados com GA₃ a uma mesma concentração (2,88 μM). Entretanto, os brotos oriundos do tratamento T2 (4,5 μM de BAP) ainda mantiveram uma média de crescimento significativamente maior que os oriundos do T0. Esse fato demonstra que, para *Schinus terebinthifolius* Raddi, o tratamento inicial com o BAP continuou influenciando o positivamente no crescimento dos brotos mesmo durante a posterior fase de alongamento (Figura 5).

Conclusões

Baseado nos resultados expostos pode concluir o seguinte:

- 1) Para o estabelecimento *in vitro* da Aroeira da praia, o explante mais indicado é o segmento nodal.
- 2) Os segmentos internodais desenvolvem apenas calos, não induzem brotos adventícios.
- 3) Considerando os parâmetros número e altura média dos brotos, o tratamento T2 (4,5 μ M de BAP) é o mais responsivo para *Schinus terebinthifolius* Raddi.
- 4) O tratamento inicial com o BAP influencia positivamente no crescimento dos brotos mesmo durante a posterior fase de alongamento.

Referências

- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência agrotecnica.**, v.24, n.1, p. 174-180, 2000.
- BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 456-461, 1999.
- CARVALHO, C. P. DA S.; CORREIA, D.; BENBADIS, A. K.; LUZ, J. M. Q.; ROSSETTI, A. G. *In vitro* culture of *Spondias mombim* L. nodal segments. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, 2002.
- DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. *In vitro* propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, v.15, p. 615-619, 1996.
- FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira santa (*Mautenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n 3, p. 201-205, 1998.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. v. 1. p. 183-260.
- MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: UFC, 2002. v.4, p83-88.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.77, n.6, p. 649-657, 2002.

OLIVEIRA, A. J. B.; CARVALHO, V. M.; FERREIRA, A., SATO F.Y.; MACHADO F.P.S.; *in vitro* multiplication of *tabernaemontana fuchsiaefolia* L.(apocynaceae) **Revista Árvore**, v.27, n.4, p.421-425, 2003.

SABÁ, R.T; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.

TORRES, D. M. G. **Catálogo de plantas medicinais (y alimentícias y utiles) usados em paraguay**. Asunción, 1981.p. 121-129.

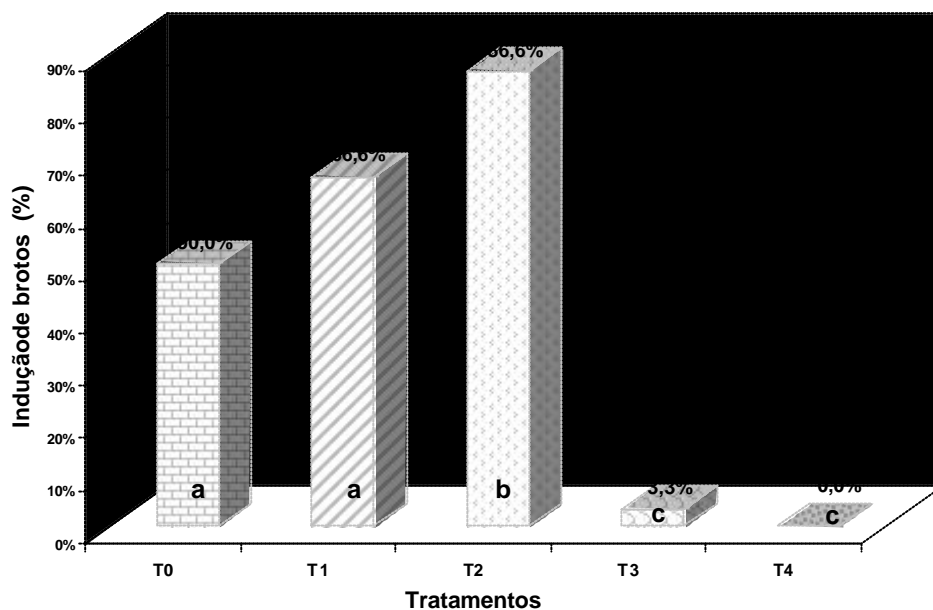


Figura 1. Taxa de indução de brotos (TIB%) de *Schinus terebinthifolius* a partir de segmentos nodais cultivados em diferentes concentrações de BAP. T0: controle; T1: 2,25 μM de BAP; T2: 4,5 μM de BAP; T3: 9,0 μM de BAP; T4: 18 μM de BAP. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

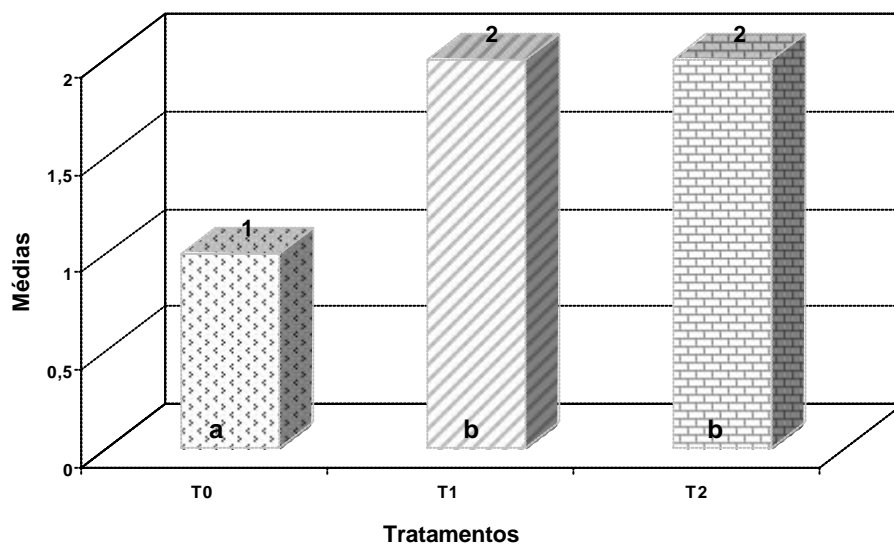


Figura 2. Número médio de brotos por explante em função de diferentes tratamentos, no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de aroeira da praia. T0: controle; T1: 2,25 μM de BAP; T2: 4,5 μM de BAP. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

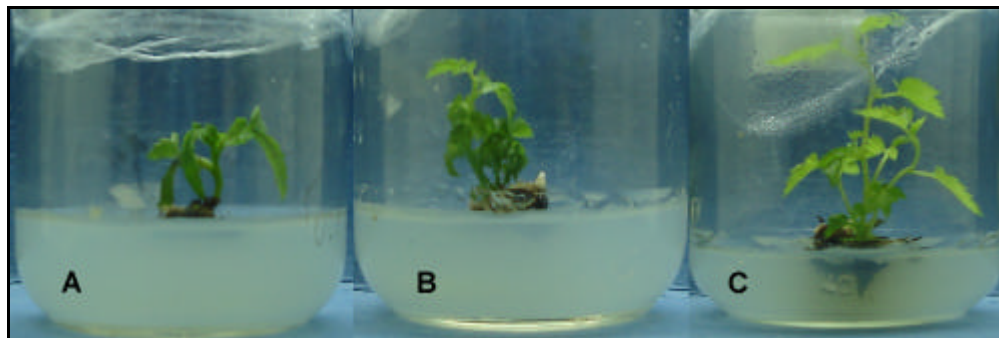


Figura 3. Aspecto geral dos brotos adventícios regenerados a partir de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius* cultivados em diferentes concentrações de BAP. A: meio controle; B: MS + 2,25 μM de BAP; C: MS + 4,5 μM de BAP.

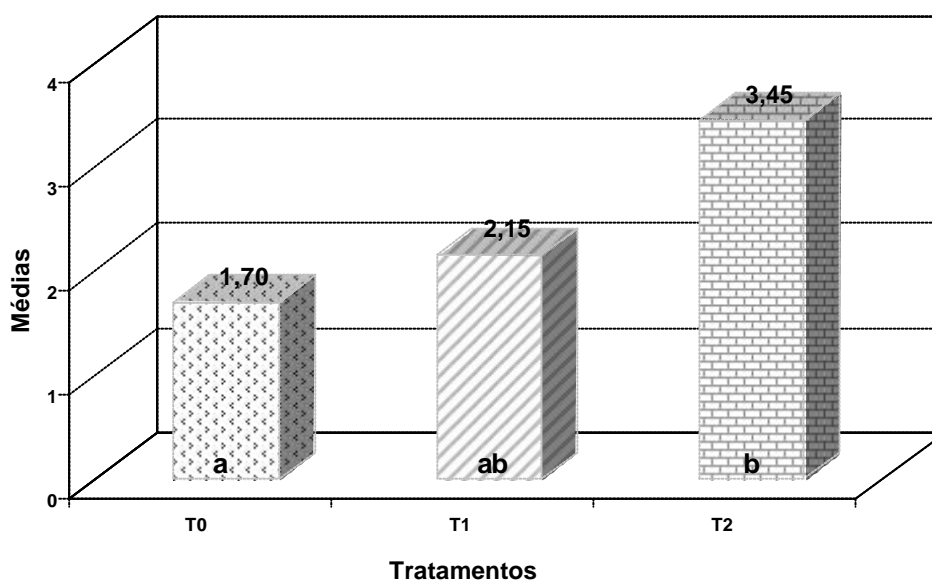


Figura 4. Médias do comprimento de *Schinus terebinthifolius* a partir de segmentos nodais cultivados em diferentes concentrações de BAP. T0: controle; T1: 2,25 μM de BAP; T2: 4,5 μM de BAP; T3: 9,0 μM de BAP; T4: 18 μM de BAP. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

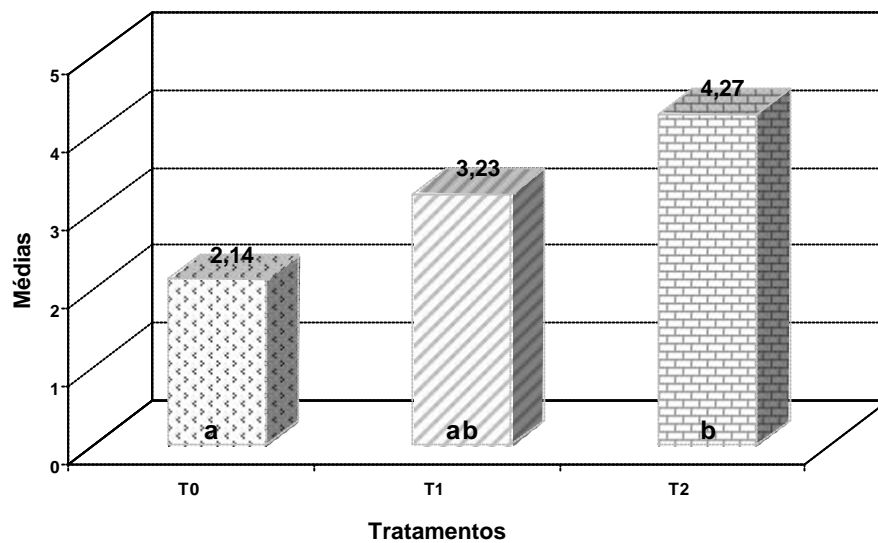


Figura 5. Médias do alongamento de brotos de *Schinus terebinthifolius* em 2,88 μM de GA_3 (ácido giberélico). Brotos oriundos do cultivo de segmentos nodais em diferentes tratamentos, T0: controle; T1: 2,25 μM de BAP; T2: 4,5 μM de BAP. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

ARTIGO 2**TÍTULO**

Controle da oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi

AUTORES

Alessandra Maria de Sousa Paiva e Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa

Controle da oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de aroeira da praia *Schinus terebinthifolius* Raddi¹

Resumo – O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito dos antioxidantes sobre a taxa de oxidação e o número de brotos regenerados em segmentos nodais de aroeira da praia desenvolvidas em de casa de vegetação. O meio de cultivo utilizado foi o MS suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol e 6 g.L⁻¹ ágar. Foram testados os seguintes antioxidantes: carvão ativado (3,0; 5,0 e 10 g.L⁻¹), ácido ascórbico (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) e polivinilpirrolidone PVP (100, 150 e 200 mg.L⁻¹). Os meios 10 g.L⁻¹ de carvão ativo e 200 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico proporcionaram os melhores resultados quanto à redução da oxidação fenólica, enquanto o PVP mostrou-se ineficaz. Apenas os meios acrescidos com carvão ativo na concentração de 10 g.L⁻¹ permitiram a regeneração de brotos.

Termos para indexação: antioxidante, polivinilpirrolidone, carvão ativo, ácido ascórbico.

Oxidation control in the *in vitro* establishment of aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi

Abstract – The objective of this study was to evaluate the antioxidants effect on the reduction of oxidation rate and shoot number in nodal segments of aroeira da praia developed in greenhouse. The MS medium was supplemented with 30 g.L⁻¹ of sucrose, 0.1 g.L⁻¹ of myo-inositol e 6 g.L⁻¹ agar. The antioxidants activated charcoal (3.0; 5.0 and 10 g.L⁻¹), ascorbic acid (100, 150 and 200 mg.L⁻¹) and polivinilpirrolidone PVP (100, 150 and 200 mg.L⁻¹) were tested. The media with 10 g.L⁻¹ of activated charcoal and 200 mg.L⁻¹ of ascorbic acid provided the best results reduction of the phenolic oxidation, while PVP was inefficient. Just media with 10 g.L⁻¹ of activated charcoal allowed shoot regeneration.

Index terms: antioxidants, polivinilpirrolidone, activated charcoal, ascorbic acid.

Introdução

Schinus terebinthifolius Raddi, também conhecida como aroeira da praia, é uma planta nativa da família Anacardiaceae, comum no litoral dos estados do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro. É uma árvore ornamental que mede de 5-10 m de altura, com propriedades medicinais, sendo suas folhas e cascas comumente utilizadas como adstringentes, antidiarréicas, depurativas, diuréticas, febrífugas, antiinflamatórias e cicatrizantes, principalmente em casos de pós-parto (Matos, 2002). Suas flores são melíferas e sua madeira é moderadamente pesada, resistente e de grande durabilidade natural, sendo utilizada para moirões, esteios, lenha e carvão (Lorenzi, 1998). Em 1999 foi lançado no Brasil um produto farmacêutico contendo o gel de aroeira extraído da sua casca, sendo este muito utilizado para tratar cervicites e corrimento genital Amorim (2003).

Apesar de essa espécie propagar através de estacas e possuir uma taxa de germinação relativamente alta, é necessário que haja uma propagação homogênea para que princípios ativos sejam conservados. Amaral e Silva (2003) verificaram que o controle qualitativo e quantitativo dos princípios ativos das plantas no meio ambiente é muito difícil, uma vez que existem variações nos tipos e nos teores de substâncias ativas, devido à interação do genótipo com o meio ambiente. Neste contexto, a biotecnologia pode auxiliar, através da utilização de técnicas de propagação *in vitro*, no desenvolvimento de plantas assépticas e idênticas, preservando assim suas estruturas morfológicas para que se possam extrair seus compostos químicos para fabricação de medicamentos fitoterápicos.

O estabelecimento *in vitro* de espécies nativas apresenta alguns problemas em função de suas características peculiares, como a oxidação. A liberação de compostos fenólicos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes acarretando a necrose e morte do material vegetal Medeiros (2001). Segundo Ibrahim (1987), as plantas superiores produzem várias substâncias denominadas metabólitos secundários os quais, são, em sua maioria, de natureza fenólica. George e Sherrington (1984), relatam que a oxidação fenólica se dá pela enzima polifenol oxidase, que contém íons cobre para sua ativação e está presente nos plastídios. A oxidação dos polifenóis leva à produção de substâncias amareladas de composição complexa, do tipo quinonas. Essas substâncias podem se ligar a proteínas das membranas ou enzimas, acarretando toxidez e morte da célula.

Estudos realizados por Medeiros (2001) revelam a presença de alguns compostos polifenólicos na aroeira, como taninos e flavonóides, principais constituintes da casca, o que pode dificultar o estabelecimento *in vitro* dessa espécie. A remoção dos compostos polifenólicos contribui para a redução oxidativa do cultivo *in vitro*. A adição de compostos

antioxidantes, como ácido ascórbico, e adsorventes, como carvão ativado e polivinilpirrolidone (PVP), podem ser decisivos na diminuição da oxidação.

Devido à escassez de trabalhos sobre o efeito de antioxidantes na redução da oxidação polifenólica na aroeira, o objetivo deste estudo foi definir protocolos para o controle da oxidação de segmentos nodais no estabelecimento de *Schinus terebinthifolius*, buscando otimizar a taxa de multiplicação *in vitro*.

Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no período de Março a Setembro de 2006. Os explantes foram retirados de plantas com aproximadamente 8 meses de idade cultivadas em casa de vegetação a partir de sementes

Ramos de *Schinus terebinthifolius* de 10 cm de comprimento foram coletados e desinfestados com etanol a 70% por 3 minutos e, posteriormente, imersos em hipoclorito de sódio a 2% por 15 minutos. Após a desinfestação, os mesmos foram lavados por três vezes em água destilada e autoclavada. Em capela de fluxo laminar, segmentos nodais com aproximadamente 10 mm foram removidos e inoculados individualmente em frascos de 300 ml contendo 30 ml de meio de Murashige e Skoog (1962) acrescido de 30 g.L⁻¹ de sacarose, 0,1 g.L⁻¹ de mio-inositol, 4,5 µM de BAP suplementado com os seguintes antioxidantes: carvão ativado (3,0; 5,0 e 10 g.L⁻¹), ácido ascórbico (100, 150 e 200 mg.L⁻¹) e polivinilpirrolidone (PVP) (100, 150 e 200 mg.L⁻¹). O meio foi solidificado com 6,0 g.L⁻¹ de agar e o pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem dos meios por 20 minutos a 121°C.

As culturas foram mantidas no escuro por 7 dias em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, e depois transferidos para fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 27 µM.m⁻².s⁻¹ a mesma temperatura.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições de 10 unidades amostrais contendo um explante cada. As observações foram feitas após 30 dias de cultivo *in vitro*, considerando os seguintes parâmetros: taxa de indução de brotos e número dos mesmos e taxa de oxidação. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Resultados e discussão

A partir do décimo dia de cultivo, observou-se o escurecimento nas extremidades do explante e o início da brotação. A partir dos vinte dias a oxidação começava a se tornar intensa, sendo visualizado apenas uma pequena parte íntegra no explante. Modgil et al., (1999) relatam que a oxidação fenólica é um dos sérios problemas que podem dificultar o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*, de plantas frutíferas e principalmente de espécies lenhosas. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), esse problema é particularmente sério no isolamento de explantes de espécies lenhosas, cujos tecidos são mais ricos em compostos fenólicos, precursores da síntese de lignina.

Nos tratamentos com PVP, foi observada uma taxa de oxidação dos explantes de 100%, o que representa um aumento significativo da oxidação quando comparados ao tratamento controle (Figura 1). Estes altos níveis de oxidação causaram a morte dos explantes e impossibilitou, desta forma, o prosseguimento das culturas. Apesar de o PVP ter função adsorvente dos compostos fenólicos, ele não se mostrou efetivo para minimizar o processo natural de oxidação da aroeira da praia, ao contrário, do constatado por Schuchovski (2002) a adição de PVP no meio de cultura, reduziu a oxidação em explantes de amoreira-preta (*Rubus* sp.). Paiva (2000) trabalhando com segmentos nodais de *Litchi chinensis* Sonn verificou que a adição de PVP não foi eficiente no controle da oxidação *in vitro*. Embora não se tenha determinado as causas para o estabelecimento da oxidação, pressupõe-se que as doses de antioxidante presentes no meio foram insuficientes para eliminar o efeito tóxico dos compostos fenólicos liberados pelos tecidos lesionados, ou talvez a velocidade de absorção do antioxidante pelos explantes foi menor do que a necessária para minimizar a oxidação dos tecidos.

A concentração de 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico não proporcionou mudanças significativas quando comparado ao tratamento controle, concordando com Erig e Schuch (2003), que observaram que a utilização de ácido ascórbico na concentração de 100 mg.L⁻¹ não foi capaz de controlar a oxidação em macieira (*Malus domestica*). No presente trabalho, dentre os tratamentos que utilizavam o ácido ascórbico, a concentração de 200 mg.L⁻¹ foi a única a apresentar resultados positivos na redução do escurecimento, apresentando uma taxa de oxidação de 45%, porém não diferiu da taxa verificada no tratamento com 150 mg.L⁻¹ (Figura 2), porém a diminuição da taxa de oxidação não possibilitou a emissão de brotos. Gupta (1986) relata que a adição de ácido ascórbico tem sido a mais utilizada para prevenção da oxidação fenólica em culturas *in vitro* de bananeira. Flores et al., (1998) observaram que baixas concentrações de ácido ascórbico (0,05% e 0,2%) foram eficientes no controle da

oxidação em explantes da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), entretanto, quando da utilização de maiores doses houve uma redução no número de brotos regenerados.

Nos tratamentos que utilizavam o carvão ativado, a concentração de 3 g.L⁻¹ apresentou a maior taxa de oxidação (98%) e a concentração de 5 g.L⁻¹ não provocou uma resposta significativa no combate à oxidação, quando comparada ao meio controle (Figura 3). Segundo Das et al., (1996), a melhora no desenvolvimento *in vitro* vem sendo demonstrada para várias espécies de plantas cultivadas em meio contendo 0,5% de carvão ativo para adsorção de compostos fenólicos, porém, no presente trabalho, a mesma concentração não mostrou baixos níveis de oxidação. O carvão ativado, quando utilizado na concentração de 10 g.L⁻¹ diminuiu drasticamente o nível de escurecimento dos explantes, apresentando uma taxa de 39%, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Figura 3). Este fato discorda de Raghuvanshi e Srivastava (1995), que utilizaram o carvão ativo para o controle da oxidação no cultivo *in vitro* de *mangifera indica* (anacardiaceae) e obtiveram apenas 2% de sobrevivência dos explantes. Os autores relatam as dificuldades no estabelecimento dos explantes associadas à exudação de compostos fenólicos, impedindo a micropropagação. Gogte e Nadgauda (2000) relatam a dificuldade na manutenção de calos embriogênicos de *Anacardium occidentale* devido aos compostos fenólicos, mesmo com adição de 0,5% de carvão ativado, enquanto Das et al., (1996) obtiveram sucesso na adição do carvão no cultivo *in vitro* da mesma espécie. Provavelmente devido ao genótipo utilizado secreta concentrações baixas de compostos polifenólicos.

As maiores concentrações testadas para os diferentes antioxidantes proporcionaram as menores taxas de oxidação, exceto para o PVP, que apresentou uma taxa de 100% em todas as doses. As concentrações de 200 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e 10 g.L⁻¹ de carvão ativado reduziram significativamente o nível de escurecimento dos explantes, com taxas de 45% e 39%, respectivamente, não diferindo significativamente entre si (Figura 4). Melo et al., (2001) também verificaram que o PVP foi pouco eficiente no controle da oxidação de guarirrobeira (*Syagrus oleracea*) cultivada *in vitro*, quando comparado aos tratamentos com carvão ativado e ácido ascórbico.

Apenas a concentração de 10 g.L⁻¹ de carvão ativado permitiu a regeneração de brotos (Apêndice 3). A taxa de indução de brotações neste tratamento corresponde a 50% e os segmentos nodais regeneraram em média um broto por explante, números significativamente inferiores aos obtidos para o tratamento controle (Figura 5). O carvão ativado é um componente que tem sido freqüentemente adicionado aos meios de cultura de tecidos vegetais

com sucesso, mas de cujos efeitos ainda não se possui bom entendimento. Entretanto, existem considerações de que o carvão ativado promove a adsorção de hormônios, como as auxinas e citocininas (Costa et al., 2006), o que pode explicar a redução na taxa de indução e no número de brotos, uma vez que é indeterminada a concentração de BAP disponível para as culturas, devido à adsorção de parte do fitorregulador pelo carvão, sendo, provavelmente, necessário ensaios com aumento progressivo dos níveis exógenos da citocinina objetivando a obtenção de maiores taxas de multiplicação de *Schinus terebinthifolius*.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- 1) As concentrações de 200 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e 10 g.L⁻¹ de carvão ativado foram igualmente eficientes na minimização dos efeitos negativos da oxidação polifenólica no estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de aroeira da praia, enquanto os explantes tratados com diferentes concentrações de PVP apresentaram altos níveis de escurecimento.
- 2) A concentração de 10 g.L⁻¹ de carvão ativado permitiu a regeneração de brotos, porém a taxa de indução e o número de brotos foram inferiores aos obtidos para o tratamento controle, O que credencia o meio de cultura sem antioxidante para a propagação *in vitro* de *Schinus terebinthifolius*.

Referências

- AMORIM, M. M. R. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clinico randomizado. **Revista brasileira de ginecologia**, Rio de Janeiro, v.25, n.2, p. 95-102, 2003.
- AMARAL, C.L.F; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnologico de plantas medicinais. **Biotechnologia ciência e desenvolvimento**, v.30, p.55-59, 2003.
- COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. grand naine (AAA). **Revista de Fruticultura Brasileira**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.
- DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. *In vitro* propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, Calcutta, v.15, p. 615-619, 1996.
- ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento *in vitro* de plantas de macieira (*Malu domestica* Borkr) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.9, n. 3, p 221-227, 2003.
- FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira santa (*Mautenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.4, n 3, p. 201-205, 1998.
- GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, In: exegetics, handbook and diretory of commercial laboratories**. London: Exegetics, p.709, 1984.
- GOGTE, S.; NADGAUDA, R. Induction of somatic embryogenesis in cashewnut (*Anacardium occidentale* L.). **Society for *in vitro* Biology**, Pune, v.36, p 41-46, 2000.
- GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal mutiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.6, p33-39, 1986.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, v. 1. p. 183-260, 1998.

IBRAHIM, R.H. Regulation of synthesis of phenolics. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plant: cell culture in phytochemistry**. San Diego: Academic Press, v.4. p.77-95, 1987.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. Plantarum, p.20, 2002

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. Fortaleza: Editora UFC, p. 83-88. 2002. MEDEIROS, M.G.F. **Influência dos adjuvantes tecnológicos na qualidade dos extratos secos atomizados da *Schinus terebinthifolius* Raddi “Aroeira da praia” (Anacardiaceae)**. 2001. Dissertação de mestrado Natal UFRN, P.129, 2001.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO; J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirobeira [*Syagrus oleácea* (Mart.) Becc.]. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 25, n. 6, p.1301-1306, 2001.

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemán's Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PAIVA, P. D. O.; Mesquita, A. C.; Paiva, R.; Gomes, G. A . C.; Santos, M. B. Miwa, L. N. Estabelecimento *in vitro* de segmentos foliares e nodais de lichieira (*Litchi chinensis* Sonn.) In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA – 25 a 29 de 2000. **Resumo** Lavras.

RAGHUVANSHI, S.S.; SRIVASTAVA, A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Lucknow v.41, p 83-85, 1995.

SCHUCHOVSKI, C. S. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agraria**, Paraná, v.3, n.1-2, p.113-132, 2002.

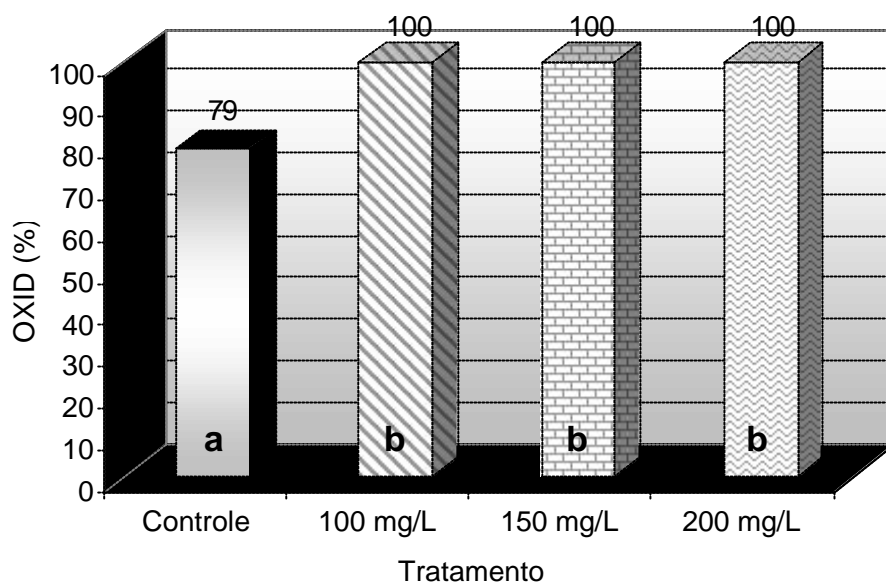


Figura 1. Taxa de oxidação (OXID) no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius* tratados com polivinilpirrolidone (PVP). Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

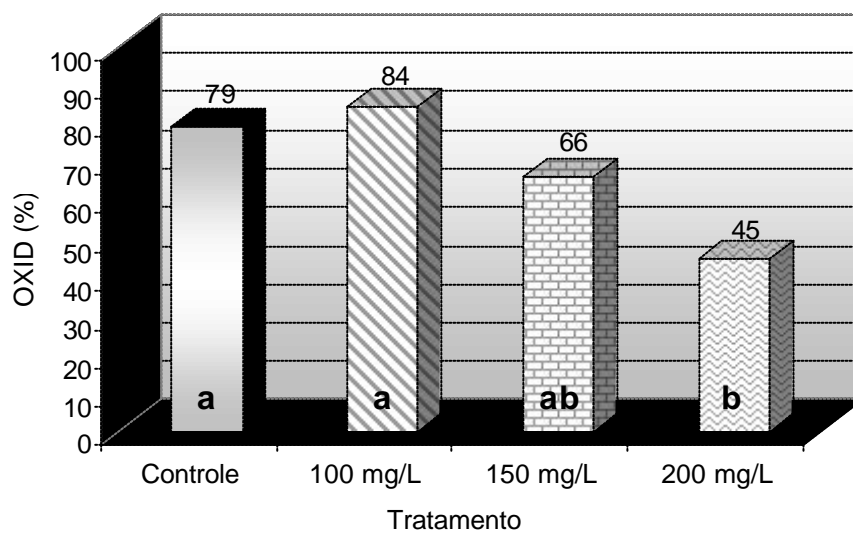


Figura 2. Taxa de oxidação (OXID) no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius* tratados com ácido ascórbico. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

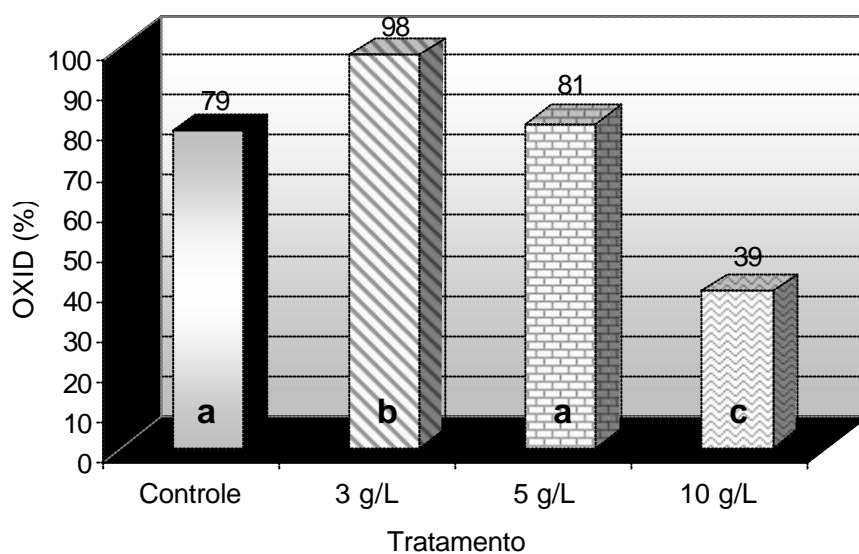


Figura 3. Taxa de oxidação (OXID) no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius* tratados com carvão ativado. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

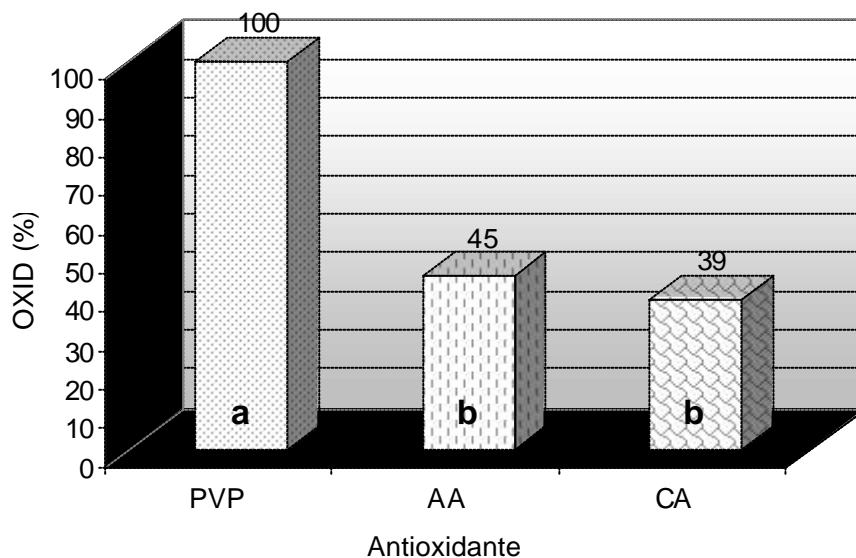


Figura 4. Comparação entre as taxas de oxidação (OXID) obtidas na utilização das concentrações de 200 mg.L⁻¹ de polivinilpirrolidone (PVP), 200 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico e 10 g.L⁻¹ de carvão ativado, no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius*. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

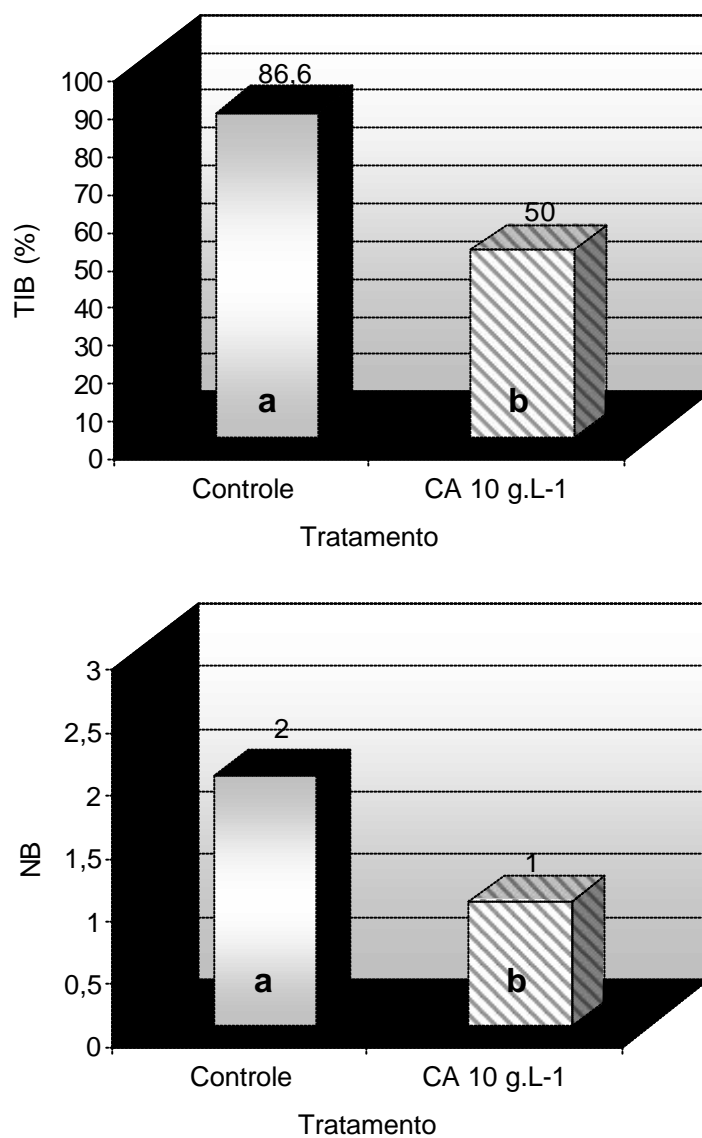


Figura 5. Taxa de indução de brotos (TIB) e número médio de brotos (NB) nos tratamentos controle e com 10 g.L⁻¹ de carvão ativado (CA), no cultivo *in vitro* de segmentos nodais de *Schinus terebinthifolius*. Médias com letras iguais não diferem entre si segundo o teste de Tukey a 5% de significância.

ARTIGO 3**TÍTULO**

Estudo anatômico comparativo de plantas de *Schinus terebinthifolius* Raddi cultivadas *in vitro*
e *ex vitro*

AUTORES

Alessandra Maria de Sousa Paiva, Magdi Ahmed Ibrahim Aloufa e Juliana Espada Lichston

**Estudo Anatômico Comparativo de Plantas de *Schinus Terebinthifolius* Raddi
Cultivadas *In Vitro* e *Ex Vitro***

Resumo - O objetivo desse estudo foi comparar a anatomia de raízes, caules e folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e depois utilizadas para a regeneração *in vitro* em meio MS. Os órgãos vegetativos foram coletados, fixados em FAA₇₀ e desidratados em série etílica. Foram obtidos cortes transversais (10µm), em micrótomo rotativo e submetidos a um processo de dupla com safranina (1%) e azul de alcian (1%). Ambas as faces foliares e o caule foram observados em microscópio eletrônico de varredura para o reconhecimento da morfologia da cera e dos tricomas nas folhas, além dos ductos secretores no caule. As raízes *ex vitro* apresentam-se em crescimento secundário com ductos na sua periferia. A raiz *in vitro* é tetraarca, com pólos de xilema e encontra-se em crescimento primário, não apresentando ductos. Tanto as folhas *in vitro* como as *ex vitro* são anfiestomáticas, apresentam tricomas tectores, glandulares e ductos secretores em associação com o floema. Apresentam ainda parênquima paliçádico e lacunoso e uma fina camada cerosa de morfologia lisa. O caule possui tricomas tectores e glandulares com presença de ductos secretores. As características anatômicas seguem o padrão descrito para a família e sugerem que o cultivo *in vitro* não induz alterações anatômicas significativas.

Termo para indexação: Anacardiaceae, aroeira, anatomia, ambiente de cultivo.

A comparative anatomical study of *Schinus terebinthifolius* Raddi plants cultivated *in vitro* and *ex vitro*

Abstract – The objective in this study was to compare the roots, stems and leaves anatomies of *Schinus terebinthifolius* Raddi cultivated *in vitro* and *ex vitro*. The plants were cultivated in greenhouse and later were used for *in vitro* regeneration in MS medium. The roots, stems and the leaves were collected, fastened in FAA₇₀ and dehydrated in ethyl series. They were obtained traverse cuts (12µm) in the rotative microtome and they were submitted to the double coloration process with safranin (1%) and alcian blue (1%). Both leaf's faces and the stem were observed in electronic microscopy of scanning for the wax and trichome morphology recognition in the leaves, besides the secretory stem ducts. *Ex vitro* roots present secondary growth with ducts in the periphery. *In vitro* roots are tetrarch and present primary growth, with xylem poles and not present ducts. Both *in vitro* and *ex vitro* leaves are

amphiestomatic and present non-glandular and glandular trichomes, secretory ducts in association with the phloem, palisade and spongy parenchyma and a thin and smooth wax layer. The stem has non-glandular and glandular trichomes, with presence of secretory ducts. The anatomical characteristics follow the pattern described for the family and the *in vitro* culture doesn't induce significant anatomical alterations.

Index terms: Anacardiaceae, aroeira, anatomy, environment of cultivation.

Introdução

A crescente preocupação em usar produtos naturais vem provocando cada vez mais interesse nos laboratórios farmacêuticos em explorar substâncias químicas vegetais. O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta, calcula-se que se disponha de algo entre 60 a 250 mil espécies vegetais, das quais 40% devem conter propriedades terapêuticas. As plantas com propriedades medicinais são de grande interesse na biotecnologia, o estudo de métodos pelos quais o potencial produtivo de células vivas podem ser usadas em processos industriais e na produção de materiais na agricultura, florestas, horticultura e medicinais podem ser lucrativos (Fidelis, 1998).

A cultura de tecidos e células vegetais contribui como alternativa promissora para o suprimento de material constante e homogêneo com especial atenção tem sido dada a plantas que contém compostos úteis à medicina e farmacologia. Como exemplo pode ser citado: Sacaca (*Croton cajucara* Benth) com ação antiinflamatória e antiespasmódicas; Copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) antiinflamatório e cicatrizante; espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart), analgésica e cicatrizante. A importância da cultura de tecidos em plantas medicinais vem sendo comprovada através de estudos das plantas e de suas partes, cujo valor medicinal tenha sido confirmado pelas pesquisas (Amaral e Silva, 2003).

A aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi é conhecida popularmente no Brasil como aroeira da praia, aroeira do Paraná, aroeira pimenteira e aroeira vermelha. É uma planta da família Anacardiaceae, encontrada facilmente em terrenos arenosos da mata atlântica litorânea no Nordeste do Brasil. Muito utilizado em carvoarias, arborização urbana e com destaque na medicina popular. O decocto da casca tem sido tradicionalmente utilizado para tratar cervicites e corrimento genital. Múltiplos mecanismos de ação têm sido descritos demonstrando atividade antiinflamatória (Amorim, 2003).

A produção em larga escala dessa planta através de técnicas de cultura de tecidos pode beneficiar aos pequenos e médios laboratórios farmacêuticos, fornecendo material vegetal

geneticamente uniforme possibilitando a extração do seu princípio ativo para fabricação de medicamentos fitoterápicos.

Plantas lenhosas propagadas *in vitro* são freqüentemente afetadas por excessiva presença de fatores do meio de cultura que conduzem à degradação metabólica e morfológica. Desordens anatômicas, morfológicas e fisiológicas nos tecidos de plantas cultivadas *in vitro* têm sido descrita sob diversas terminologias: vitrificação, translucidez, hiperhidratação, suculência e transparência. As modificações são manifestadas principalmente nas folhas, afetam os dois principais processos executados pelas folhas, isto é, a fotossíntese e as trocas gasosas (CO₂, H₂O e vapor). As desordens anatômicas são menos extensas no caule e raízes. Estas modificações impedem o estabelecimento *ex vitro* de plantas micropropagadas (Debergh e Maene, 1984).

O objetivo desse estudo é descrever aspectos anatômicos de órgãos vegetativos da aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) desenvolvidos em casa de vegetação e *in vitro* por organogênese direta, estabelecendo as semelhanças e diferenças entre as plantas nas duas condições de cultivo.

Material e métodos

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, do departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia, do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

No estudo anatômico, foram usadas raízes, caules e folhas de *Schinus terebinthifolius* com idades entre 4 a 8 meses, obtidas da germinação de sementes em casa de vegetação e plantas regeneradas *in vitro*, em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). O material botânico foi fixado em FAA 70% (Johansen, 1940) e posteriormente conservado em álcool etílico 70%. Para a confecção das lâminas permanentes o material foi desidratado em série etílica, infiltrado e incluído em parafina (Sass, 1968). Os cortes foram obtidos em micrótomo de parafina (American Optical Company, Modelo 820), com espessura de 10µm, estes foram colocados em banho maria com 1 colher de chá de gelatina em pó com temperatura constante de 43°C. Após a desparafinação e hidratação os mesmos foram submetidos ao processo de dupla coloração com Safranina (1%) e Azul de alcian (1%), segundo a metodologia descrita por Bukatsch, (1972) citado por Kraus et al., (1989). A montagem das lâminas foi feita em bálsamo do Canadá. Para as lâminas semi-permanentes foram efetuados cortes a mão livre com auxílio de lâmina de aço inoxidável, sendo estes submetidos à descoloração em solução de hipoclorito de sódio a 20% com posterior lavagem em água destilada. O material foi

corado como descrito acima, sendo as lâminas montadas com glicerina 50%. As fotomicrografias foram feitas em microscópio óptico Olympus BX60M acoplada com câmara LC Capture da MediaCybernetics.

Foram utilizados fragmentos de folhas com cerca de 6 mm² e caule com 5 mm de comprimento para as análises da morfologia em microscopia eletrônica de varredura. Os procedimentos de preparação do material seguiram as recomendações de Bondada et al, (1996) com algumas modificações, sendo as amostras revestidas de carbono. O material foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura (MEV) Philips Modelo XL30 – ESEM, tensão aceleradora de 20kV, disponível no Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura, do Núcleo de Ensino em Petróleo e Gás Natural Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e no MEV marca Jeol-JSM, modelo 5200, tensão aceleradora de 20kV do laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Resultados e discussão

Raiz

In vitro, a raiz de *Schinus terebinthifolius* apresenta-se em crescimento primário, com epiderme unisseriada, exoderme e células do parênquima cortical grandes e ordenadas radialmente. O cilindro central é ocupado apenas por tecidos vasculares, sem medula, apresentando um padrão vascular formado por quatro feixes de xilema (tetraarca) (Figura 1A), característico de eudicotiledôneas, como em *Coespeletia moritziana* Cuatrec. (Arias, 2004). As células que ocupam uma posição mais externa apresentam menor tamanho, constituindo o protoxilema. Na região central observa-se o metaxilema, com elementos de diâmetro crescente. O cilindro central é limitado externamente pela endoderme com estrias de Caspary e células de passagem.

As plantas cultivadas em casa de vegetação apresentaram raízes em transição de crescimento primário para secundário (Figura 1B), diferindo da raiz em crescimento primário pela presença de uma medula parenquimática no cilindro vascular. Nesta mesma condição de cultivo, também foram observadas raízes em crescimento secundário avançado (Figura 1C). Estas raízes apresentavam sistema vascular secundário, com o xilema, o floema e o câmbio vascular distribuídos em forma de um anel. Verifica-se ainda uma periderme bastante desenvolvida, tecido típico de crescimento secundário bem desenvolvido segundo Mazzoni-Viveiros e Costa, (2003).

A raiz apresenta em média três ductos secretores próximos à periferia (Figura 1B), logo abaixo da periderme, como verificado em *Rhus diversiloba* (McNair, 1918). Em raízes em fase de transição e desenvolvidas *in vitro*, não foram observados ductos, provavelmente porque seu desenvolvimento ocorra tardiamente, quando as raízes já apresentam uma estrutura secundária. Venkaiah e Shah, (1984) observaram que não existem ductos na raiz da anacardiácea *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merrill

Caule

In vitro e em condições de casa de vegetação, o corte transversal do caule apresentou evidências de crescimento secundário, com clara definição do câmbio vascular e ausência de felogênio. Foi verificada a presença de epiderme pluriestratificada e sobre esta uma cutícula delgada. Abaixo da epiderme encontram-se faixas de colênquima concentradas acima dos ductos secretores (Figuras 2A, 3C e 3D). De acordo com Güvenç, (1998), a anacardiácea *Rhus coriaria* apresenta um arco de esclerênquima em torno de cada canal.

Os ductos resiníferos são ovalados e estão próximos ou em associação com o floema, como em *Pistacia chinensis* (Shu-ying, 1999), com lume vazio, circundado por células epiteliais. Esses ductos já foram descritos no caule das anacardiáceas *Spondias dulces* (Sant'anna e Santos, 2006) e *Anacardium occidentale* (Nair et al., 1983). Os ductos estão localizados próximo à periferia do caule, estando presentes neste órgão desde o crescimento primário até o secundário, quando se localizam próximo da periderme. Podem ser visualizados ductos dispersos na medula parenquimática, próximos ao xilema e espaçados entre si, organizando-se em círculo (Figura 2B). Provavelmente, em plantas adultas esses ductos serão limitados ao centro devido ao desenvolvimento do xilema secundário. Nota-se apenas a ausência dos ductos secretores localizados na medula parenquimática das plantas regeneradas *in vitro* e com faixas de colênquima muito discretas.

A presença de ductos secretores de terpenos e polissacarídeos são características marcantes para família Anacardiaceae (Engler, 1896). Medeiros (2001) relata a presença de taninos, saponinas, esteróides e triterpenóides como principais constituintes da casca de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Em toda a superfície do caule nas duas condições de cultivo verifica-se a presença de tricomas tectores (não glandulares), unicelulares, pontiagudos, circundando todo o caule (Figuras 3A e B).

Folha

Em seções transversais, a folha de *Schinus terebinthifolius* apresenta mesofilo rico em cloroplastos, com parênquima paliçádico disposto em duas camadas voltadas para a face

adaxial e de parênquima lacunoso com grande quantidade de cloroplastos, constituindo assim o mesofilo dorsiventral. Shu-ying (1999) observou a existência dos parênquimas paliçádico e lacunoso na anacardiácea *Pistacia chinensis*.

Tanto nas plantas *in vitro* quanto nas de casa de vegetação, a folha é anfiestomática, estando os estômatos nas duas faces sendo a maior incidência na superfície abaxial. Os estômatos são do tipo anomocítico, localizam-se acima do nível das demais células epidérmicas e estão dispostos aleatoriamente, uma organização típica das folhas de eudicotiledôneas. Figueirôa et al., (2004) relatam a ocorrência de folhas hipoestomáticas e estômatos anomocíticos em aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). Araque e Gámez (2004) observaram estômatos do tipo paracítico apenas na face abaxial em folhas de *Ochoterenaea colombiana* Barkley. Boeger e Wisniewski (2003) também relatam que a anacardiácea *Tapirira guianensis* Aubl., possui folha hipoestomática. As folhas *in vitro* apresentam uma grande quantidade de exsudado, expelido pelos estômatos (Figuras 4 e 6A), que podem ser um extravasamento da secreção produzida nos ductos secretores a partir da câmara subestomática. Segundo Castro e Machado (2003), as secreções podem ser liberadas para fora do corpo vegetal por meio de estômatos modificados.

Na nervura central, observa-se de 1 a 2 ductos secretores nas plantas cultivadas *in vitro* (Figuras 5A e 5E) e de 3 a 5 ductos em plantas de casa de vegetação (Figuras 5B, e5D). O menor número destas estruturas nas plantas *in vitro* pode ser atribuído ao desenvolvimento limitado da planta verificado nesta condição. Em ambos os ambientes de cultivo foram verificados ductos no limbo foliar (Figura 5C). Venkaiah e Shah (1984) e Araque e Gámez (2004) citam a presença de ductos em folhas das anacardiáceas *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merril e *O. colombiana*, respectivamente. Os vasos do floema e xilema estão associados aos ductos na nervura central, estando o floema sempre disposto ao redor dos ductos (Figura 5E), como verificado em *Pistacia chinensis* (Shu-ying, 1999).

In vitro, a epiderme adaxial apresenta, em alguns pontos, parênquima paliçádico com um relevo epidérmico bem pronunciado e sinuoso, além de um parênquima paliçádico com células túrgidas e estômatos acima do nível das demais células epidérmicas (Figura 6).

Em corte paradérmico, as células epidérmicas em *S. terebinthifolius* são vistas com paredes sinuosas, como em *Anacardium occidentale* L., *Mangifera indica* L. e *Spondias purpurea* L. (Torres e Jauregui, 1999). Segundo Vieira e Machado (1992), a sinuosidade das paredes das células epidérmicas pode ser atribuída às condições ambientais, sendo mais acentuada em plantas que se desenvolvem à sombra ou em ambientes úmidos.

Quanto à morfologia da cera foliar epicuticular, esta se apresenta lisa com poucos grânulos de cera em ambas as faces foliares e nas duas condições de cultivo (Figuras 7A e B).

Em ambas as faces, a folha possui tricomas tectores, como em *Pistacia* sp. (AL-SAGHIR et al. 2006), e glandulares com cabeça multinuclear em ambas as superfícies, sendo que em plantas *ex vitro*, os tricomas glandulares da superfície adaxial são mais volumosos (Figuras 7C e D). Martínez-Millán e Cevallos-Ferriz (2005) citam a ocorrência de tricomas glandulares em *Astronium*, *Myracrodruon*, *Schinus*, *Spondias*, *Tapirira* e *Thyrsodium*.

Podem ser verificadas numerosas drusas no limbo das folhas desenvolvidas em casa de vegetação. Estas estruturas podem estar relacionadas à defesa mecânica contra herbivoria, suporte estrutural, além de refletir a excessiva incidência de raios solares, evitando possíveis danos ao parênquima clorofiliano, o que pode explicar a ausência de drusas em folhas *in vitro*. De acordo com Boeger e Wisniewski (2003), drusas de oxalato de cálcio têm como principal função remover o excesso de cálcio da planta. Outras funções comumente associadas à presença destes cristais são: estratégia de manutenção de nutrientes, como reserva de cálcio ou oxalato para a planta.

Em conclusão, analisando estruturalmente as plantas cultivadas em condições de casa de vegetação e regeneradas *in vitro* verificou-se que os órgãos vegetativos como as folhas e o caule de aroeira apresentam estruturas básicas semelhantes. As folhas e o caule em ambas as condições possuem ductos secretores e tricomas tectores. As raízes diferem devido ao desenvolvimento *ex vitro* ser mais acelerado, iniciando seu crescimento secundário mais antecipadamente que as plantas *in vitro*.

As variações estruturais foliares com sinuosidade do relevo devido à turgescência das células do parênquima paliçádico em plantas *in vitro* são possivelmente resultantes das condições ambientais controladas e de alta umidade em que estas plantas se encontram. O desaparecimento destas alterações parenquimáticas nas plantas de casa de vegetação sugere uma plasticidade fenotípica de *Schinus terebinthifolius* Raddi à condição de cultivo em que se encontra.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao LabPlasma do Departamento de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela documentação das lâminas histológicas, ao Laboratório Institucional de Microscopia Eletrônica de Varredura (LIMEV), do Núcleo de Ensino em Petróleo e Gás Natural da UFRN e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina da USP, pela realização das eletromicrografias em MEV.

Referências

- AL-SAGHIR, M.G; PORTER, D.M.; NILSEN, E.T. Leaf Anatomy of Pistacia Species (Anacardiaceae). **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 242-244, 2006.
- AMARAL, C.L.F; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento** n.30, p.55-59, 2003.
- AMORIM, M. M. R. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia** , v.25, n.2, p. 95-102, 2003.
- ARAQUE, O.; L. GÁMEZ. Anatomía foliar y xilemática de *Ochoterenaea colombiana* Barkley. **Revista Forest**. Veneuela. v.2, n.49, 2004.
- ARIAS, R. L. Estructura primaria del sistema radical de *Coespeletia* Cuatrec. **INCI**, Caracas, v.29, n.1, p.13-18, 2004.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen Zur; doppelfargung Astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.
- BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista brasileira Botânica** v.26 n.1, 2003.
- BONDADA, R.R.; OSTERHUIS, D.M.; MURPHY, J.B.; KIM, K.S. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and boll. **Environment and Experimental Botany**, v. 1, p. 61-69, 1996.
- CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: Anatomia vegetal (Apezzato–da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M.). Viçosa: UFV, 2003. p. 179-203.
- DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to in vivo culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v.40, p. 69-75, 1984.

ENGLER, A. **Anacardiaceae:** Anatomisches Verhalten. Leipzig: Die Natürlichen Pflanzenfamilien Bd, 1896. p. 139-140.

FIDELIS, I. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* (mama-cadela) uma espécie considerada medicinal. Dissertação de mestrado Lavras: UFLA p. 109, 1998.

FIGUEIRÔA J. M.; BARBOSA D. C. A.; SIMABUKURO E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myrcodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botanica Brasilica**. n.3 v.18, 2004.

GÜVENÇ, A. Anatomy of the Barks of *Rhus coriaria* L. **Tr. J. of Botany**, v. 22, p. 419-423, 1998.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New york: McGraw-hill Book Co., 1940.

KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin doublé staining methods for plants materials. **Biotech. Histochem** 1989.

MARTÍNEZ-MILLÁN, M.; CEVALLOS-FERRIZ, S.R.S. Arquitectura foliar de Anacardiaceae. **Revista Mexicana de Biodiversidade** v.76 p. 137-190, 2005.

MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; COSTA C.G. 2003. Peridreme. In: Anatomia vegetal (Apezzato –da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M.). Viçosa: UFV. p. 237-260.

McNAIR, J.B. Secretory canals of *Rhus diversiloba*. **Botanical Gazette**, v. 65, n. 3, p. 268-273, 1918.

MEDEIROS, M.G.F. Influência dos adjuvantes tecnológicos na qualidade dos extratos secos atomizados da *Schinus terebinthifolius* Raddi “Aroeira da praia” (Anacardiaceae). 2001. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Programa de pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRN, Natal, P.129, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIR, G. M.; VENKAIAH, K.; SHAH, J. J. Ultrastructure of gum-resin ducts in Cashew (*Anacardium occidentale*). **Annals of Botany**, v. 51, p. 297-305, 1983.

SANT'ANNA-SANTOS B.F.; THADEO M.; MEIRA R. M. S.; ASCENSÃO A. L. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.3, p.481-489, 2006.

SASS, J. E. Elements of botanical microtechnique. New york. **McGarw-hill Book Co.** 22p. 1968.

SHU-YING, M.A. Anatomical study on the stem and leaf of *Pistacia chinensis*. **Journal of Jilin Agricultural University**, v.21, n.1, 1999.

TORRES, M.; JAUREGUI, D. Characterization of the leaf anatomy of four species of fruit tree: *Anacardium occidentale* L. (cashew); *Mangifera indica* L. (mango); *Spondias purpurea* L. (Spanish plum) and *Psidium guajava* L. (guava). **Ernstia**, v.9, p155-173, 1999.

VENKAIAH, K.; SHAH, J. J. Distribution, development and structure of gum ducts in *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merrill (Anacardiaceae). **Annals of Botany**, v. 54, p. 175-186, 1984.

VIEIRA, R.C.; MACHADO, R.D. Superfície foliar de *Bauhinia radiata* Vell. em dois ambientes. **Hoehnea**, v.19, p.111-116, 1992.

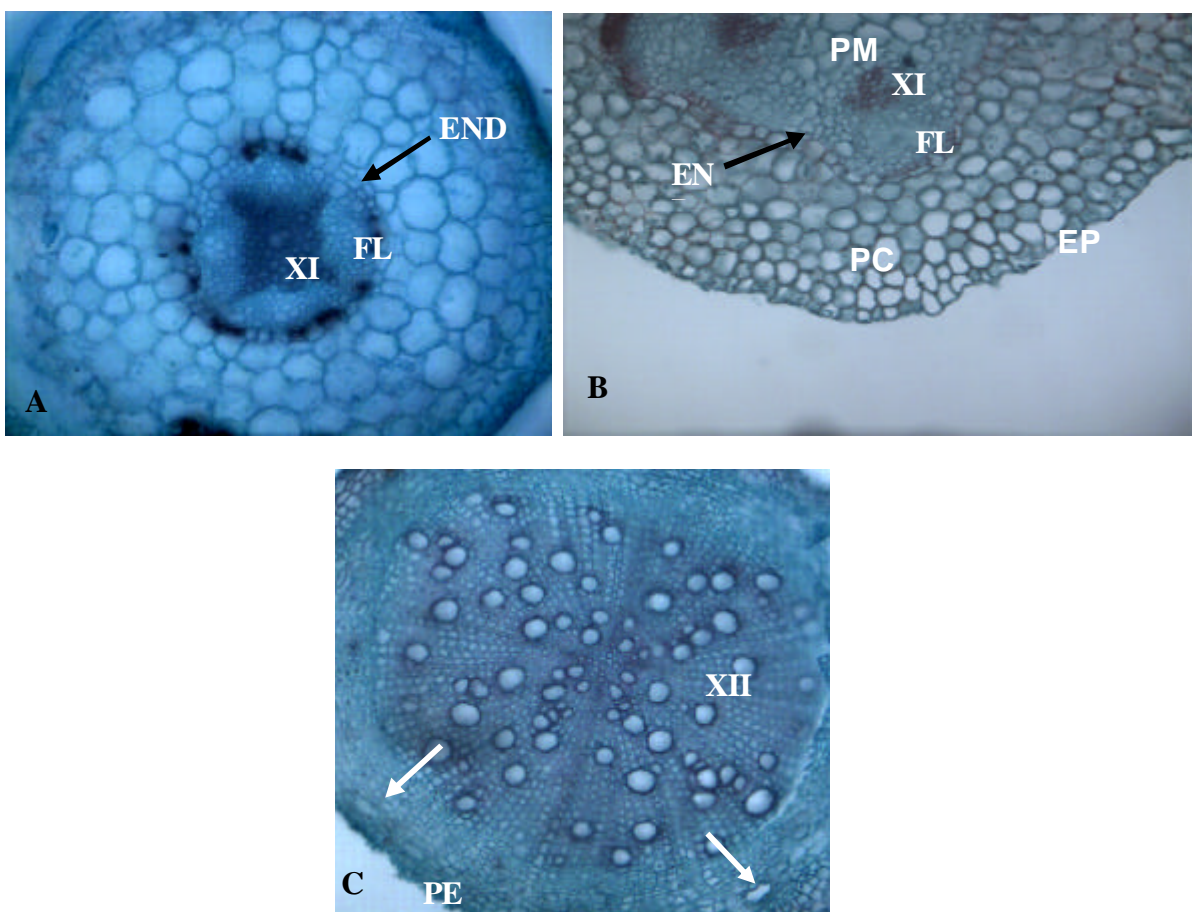


Figura 1. Seções transversais da raiz de *Schinus terebinthifolius*; A: Raiz *in vitro* apresentando quatro pólos de xilema. B-C: Raiz *ex vitro*. B: Raiz crescimento secundário apresentando ducto em sua periferia (seta) Xilema secundário = XII, PE = Periderme. C: Raiz em fase de transição para o crescimento secundário. END = Endoderme, EP = Epiderme, FL = Floema, PC = Parênquima cortical, PM = Parênquima medular, XI = Xilema primário.

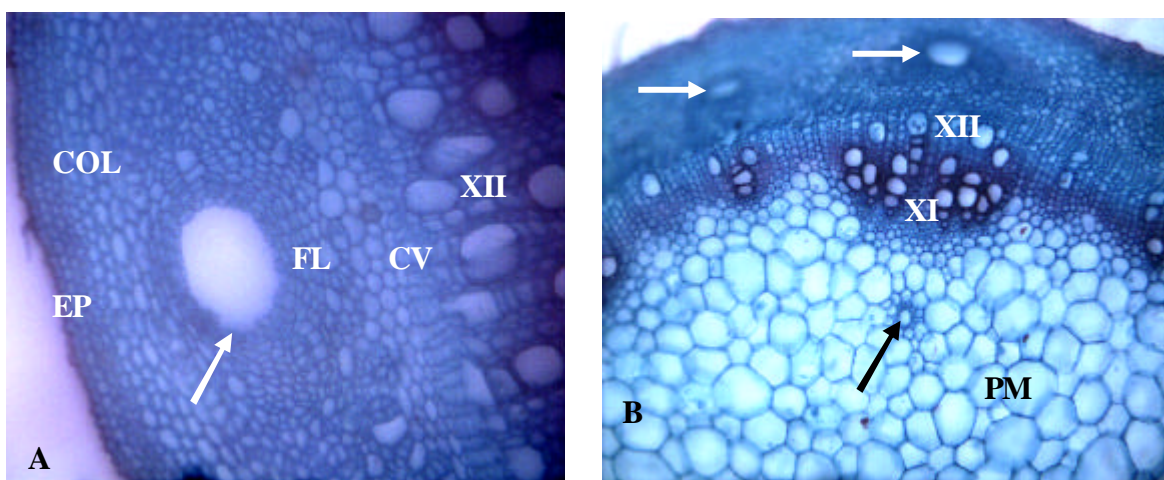


Figura 2. Seções transversais do caule de *Schinus terebinthifolius*; A-B Caule *ex vitro* EP = Epiderme, CV = Câmbio vascular, COL = Colênquima, FL = Floema primário, PM = Parênquima medular, XI = Xilema primário, XII = Xilema secundário, Setas indicando ductos secretores com lume oval.

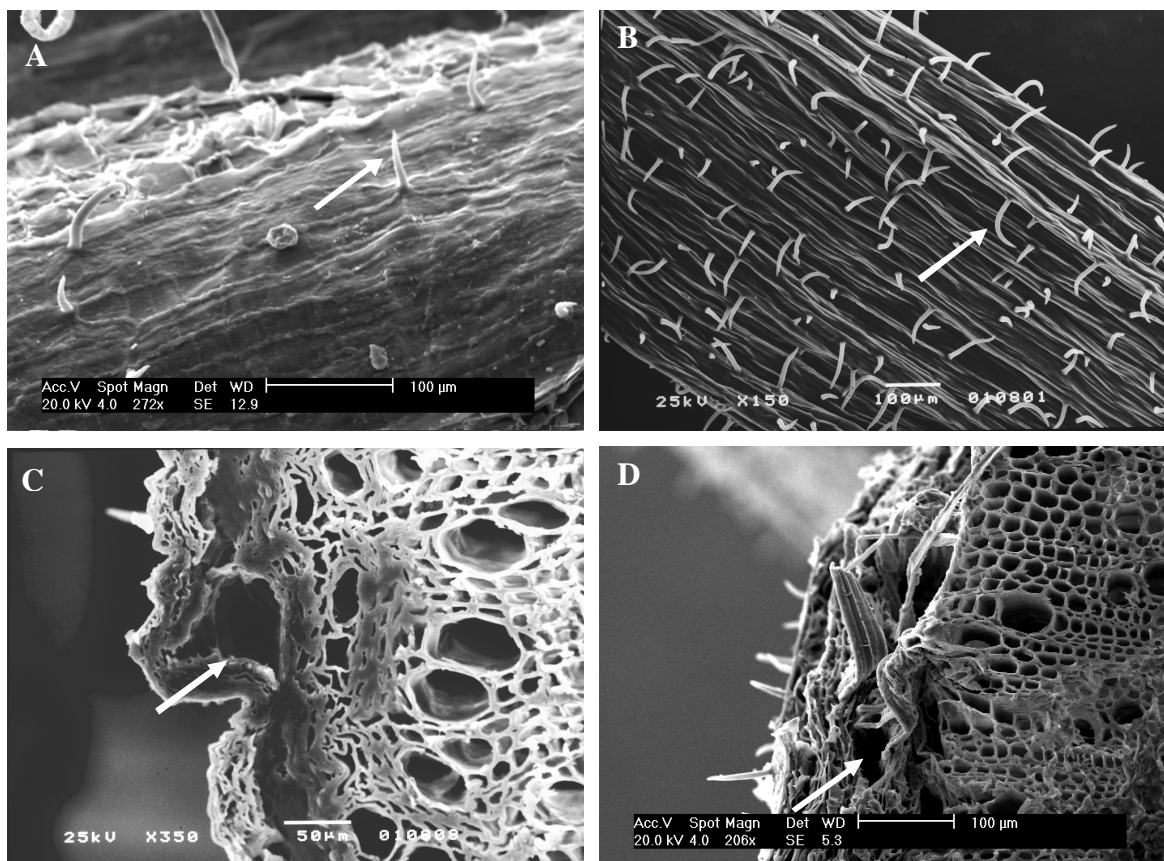


Figura 3. Eletromicrografia do caule de *Schinus terebinthifolius*. A-B: Casca do caule apresentando tricomas tectores (setas) em plantas *ex vitro* e *in vitro*, respectivamente. C-D: Corte transversal, observação dos ductos secretores (setas) *in vitro* e *ex vitro*, respectivamente.

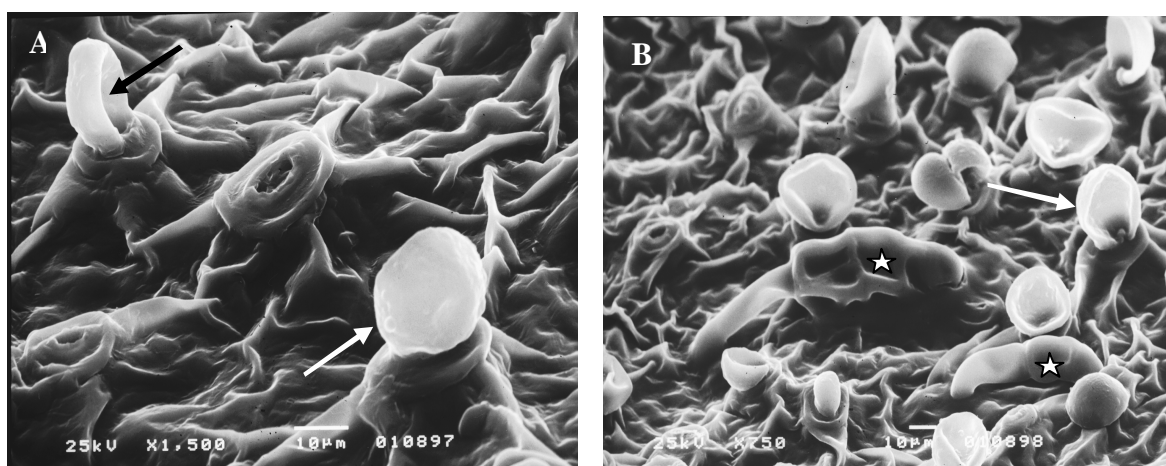


Figura 4. Eletromicrografia da folha de *Schinus terebinthifolius*. A: Liberação das secreções pelos estômatos (setas). B: Visão geral da superfície abaxial da folha *in vitro* visualizando as secreções (setas) e tricomas glandulares ☆

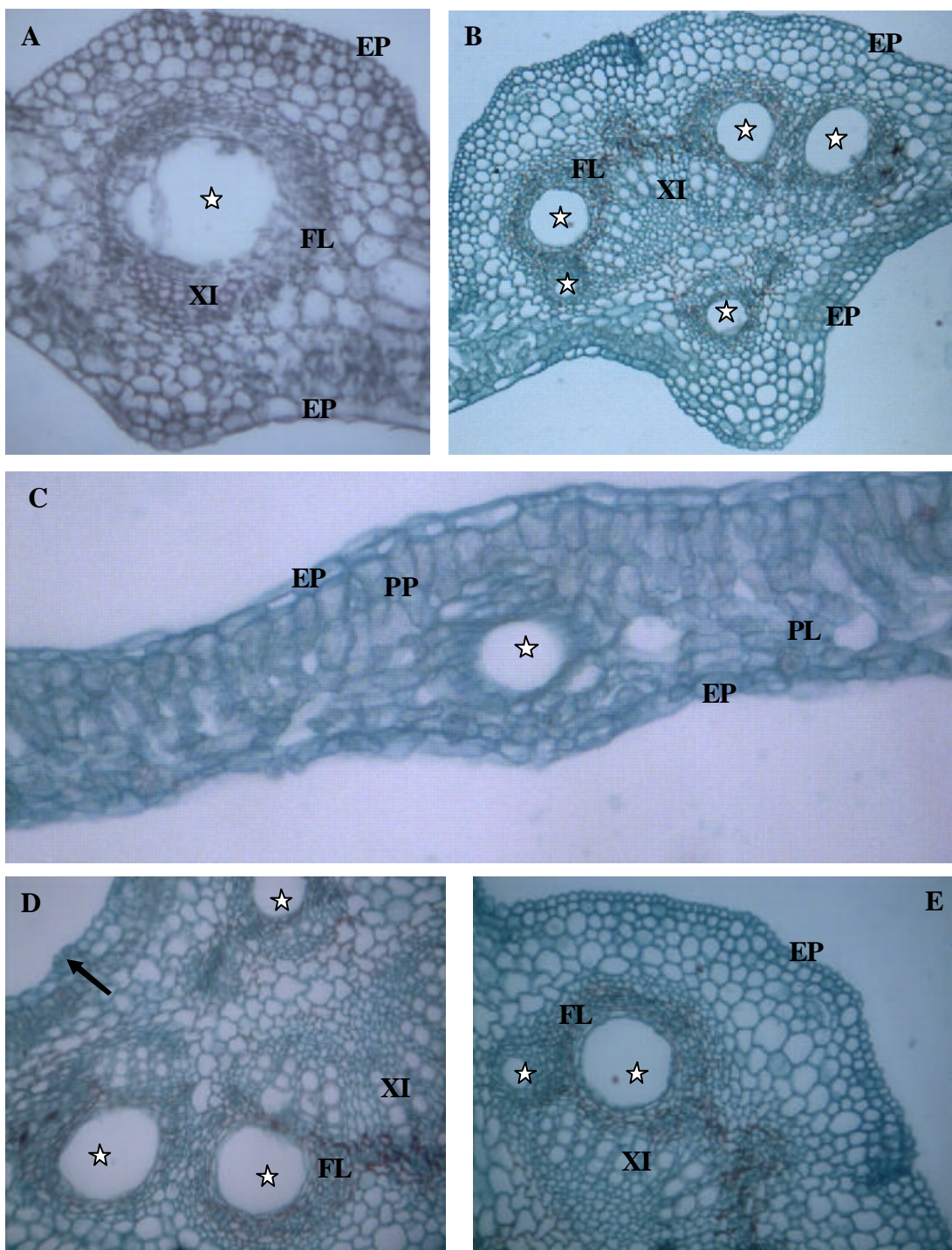


Figura 5. Seções transversais da folha de *Schinus terebinthifolius*. A: Nervura central de planta *in vitro*. B-D: Folhas *ex vitro*. B: Nervura central. C: Limbo de folha. D: Detalhe da nervura central com estômato na face adaxial (seta). E: Detalhe da planta *in vitro*. EP = Epiderme, FL = Floema, PP = Parênquima paliçádico, PL = Parênquima lacunoso, XI = Xilema primário, ☆ = ducto secretor.

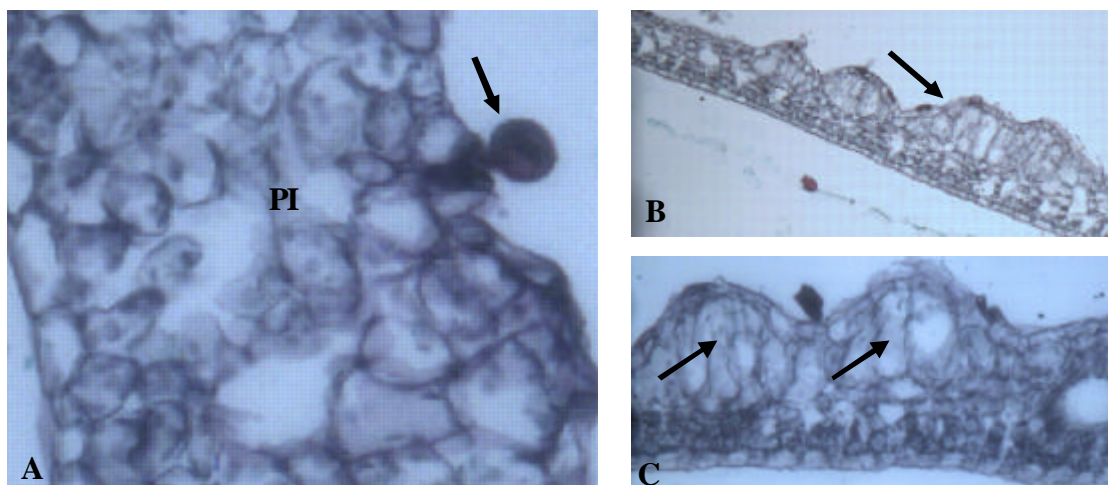


Figura 6. Seções transversais da folha de *Schinus terebinthifolius*; A: Limbo com estômato na superfície adaxial com exsudado (seta). B: Superfície adaxial com sinuosidades (seta). C: parênquima paliçádico túrgido (seta). PI = Parênquima indiferenciado.

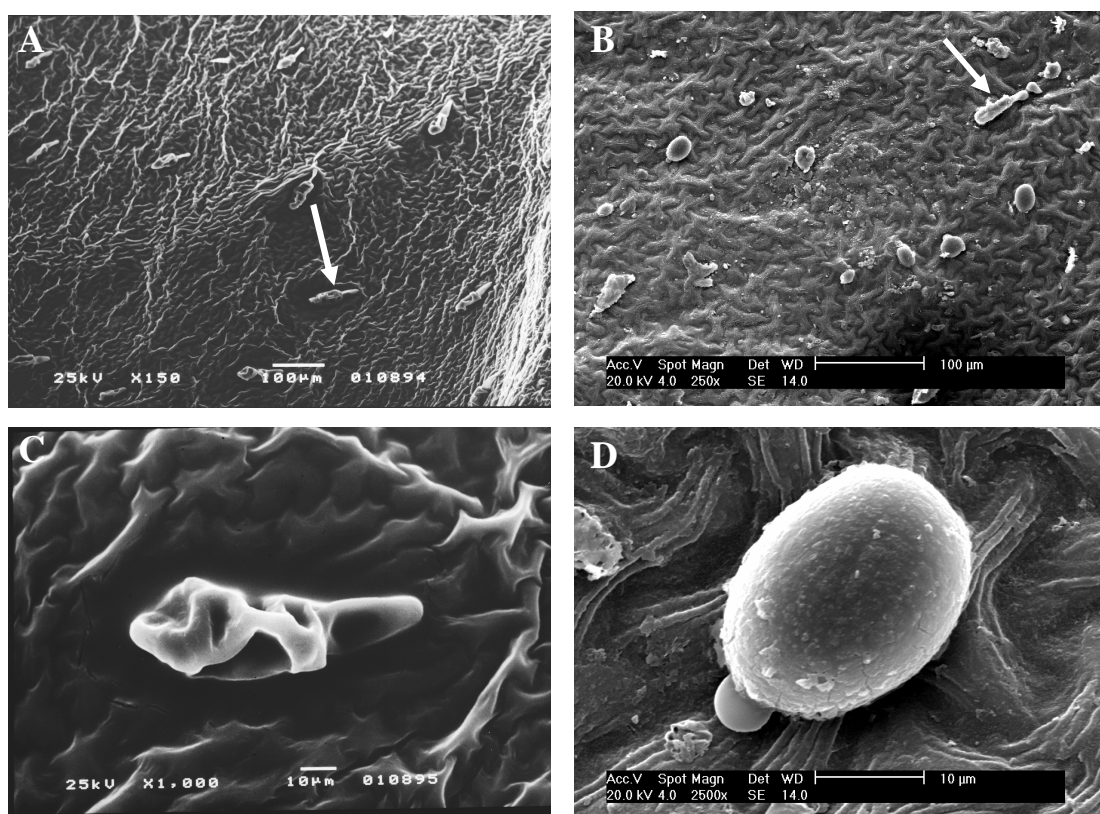


Figura 7. Eletromicrografia de varredura da superfície foliar adaxial com tricomas glandulares (setas) de *Schinus terebinthifolius*. A-B: Folha *in vitro*, vista geral e detalhe, respectivamente. C-D: Folha *ex vitro*, vista geral e detalhe, respectivamente.

A large, leafy tree with a thick trunk stands on a grassy bank next to a body of water. The text "CAPÍTULO 3" is overlaid in the center.

CAPÍTULO 3

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

A produção de mudas normalmente é efetuada através de técnicas de propagação vegetativa tradicionais, porém esses métodos restringem o número de plantas obtidas e requerem muito tempo e originam plantas de baixa qualidade fitossanitária. As técnicas de cultura de tecido *in vitro* possibilitam a produção de mudas em grandes quantidades, livres de patógenos e altamente assépticas, além de produzirem mudas com grande potencial genético.

A aroeira *Schinus terebinthifolius* Raddi, apesar de sua importância medicinal, é uma espécie nativa altamente negligenciada, haja vista que não foi encontrada na literatura qualquer referência a trabalhos que se utilizem as técnicas de cultura de tecidos para sua propagação *in vitro*. Neste trabalho foram obtidos bons resultados na regeneração dos brotos através de organogênese direta, embora este protocolo possa ser aperfeiçoado em estudos futuros testando-se outros tipos e concentrações de citocininas para a obtenção número maior de brotos de aroeira da praia, como também combinações de citocininas e auxinas, buscando produzir o maior número de plantas possível. Normalmente, na propagação *in vitro*, os reguladores de crescimento constituem-se numa primeira etapa a ser abordada (ALVES et al., 2004), porém outras variáveis também podem ser testadas, tais como variações da composição mineral, vitaminas e fontes de açúcares dos meios de cultura e modificações nas condições de incubação (PERES, 2002).

O estabelecimento *in vitro* de *Schinus terebinthifolius* é dificultada devido à liberação de compostos fenólicos, como taninos e flavonóides, que ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Buscou-se controlar a oxidação em segmentos nodais de aroeira e, desta forma, otimizar a taxa de multiplicação *in vitro*, no entanto, dentre as substâncias antioxidantes utilizadas (ácido ascórbico, polivinilpirrolidone e carvão ativado), apenas o carvão ativado a 10 g.L⁻¹ permitiu a regeneração de brotos, porém a taxa de indução e o número de brotos foram inferiores aos obtidos para o tratamento controle. Neste sentido, poderiam ser conduzidos testes com outras concentrações dos antioxidantes utilizados no presente trabalho, assim como com outros tipos de substâncias, como o ácido cítrico, seja no meio ou na forma de banho, ou ainda estratégias como lavagem em água corrente dos explantes antes da desinfestação e transferências frequentes dos explantes para meio fresco, eliminando as porções escuras de tecido, como sugerido por Grattapaglia e Machado (1998).

O estudo anatômico de *S. terebinthifolius* mostrou que as plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* apresentam-se estruturalmente muito semelhantes, o que pode contribuir para o sucesso na etapa de aclimatização das plantas cultivadas assepticamente, tendo em vista que

as plantas apresentaram poucas modificações associadas a esta condição de cultivo. Uma vez observada a existência de ductos secretores e tricomas glandulares nesta espécie, que possivelmente estão relacionados à produção dos compostos químicos utilizados pela indústria farmacológica para extração de princípios ativos, e por populares, quando da utilização das diferentes partes da planta com finalidade fitoterápica, seria interessante que, em trabalhos futuros, fossem realizados estudos químicos sobre a composição desses exsudados. É necessária uma atenção especial ao sistema secretor da aroeira da praia, investigando a sua ontogenia, locais de síntese e acúmulo das secreções e natureza química dos seus exsudados.

CONCLUSÕES

- O cultivo de segmentos nodais em meio de cultura MS básico suplementado com 4,5 μM de BAP pode ser usado para a propagação *in vitro* de *Schinus terebinthifolius*. A utilização do GA₃ na concentração de 1,0 mg.L^{-1} mostrou-se eficiente para o alongamento das culturas.
- Os segmentos nodais tratados com 200 mg.L^{-1} de ácido ascórbico e 10 g.L^{-1} de carvão ativado foram igualmente eficientes na minimização da oxidação polifenólica, enquanto os explantes tratados com diferentes concentrações de PVP apresentaram altos níveis de escurecimento.
- Apenas a concentração de 10 g.L^{-1} de carvão ativado permitiu a regeneração de brotos, porém a taxa de indução e o número de brotos foram inferiores aos obtidos para o tratamento controle.
- O estudo anatômico de *S. terebinthifolius* mostrou que as plantas cultivadas *in vitro* e *ex vitro* apresentam-se estruturalmente muito semelhantes, o que pode contribuir para o sucesso na etapa de aclimatização das plantas regeneradas em condições assépticas.

REFERÊNCIA GERAL

- ABREU, I.N. Propagação *in vivo* e *in vitro*, calogênese, nutrição mineral e quantificação de mucilagem em *Cissus sicyoides*. **Dissertação** (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, . p.101, 1998 .
- AL-SAGHIR, M.G; PORTER, D.M.; NILSEN, E.T. Leaf Anatomy of *Pistacia* Species (Anacardiaceae). **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 242-244, 2006.
- AMARAL, C.L.F; SILVA, A.B. Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento** n.30, p.55-59, 2003.
- AMORIM, M. M. R. Tratamento da Vaginose Bacteriana com Gel Vaginal de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia** , v.25, n.2, p. 95-102, 2003.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All). **Ciência. agrotecnica.**, Lavras, v.24, n.1, p. 174-180, 2000.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal. Universidade Federal** Viçosa: UFV, v.1, 2003,p.438.
- ARAQUE, O.; L. GÁMEZ. Anatomía foliar y xilemática de *Ochoterenaea colombiana* Barkley. **Revista Forest** Veneuela. v.2, n.49, 2004.
- ARIAS, R. L. Estructura primaria del sistema radical de *Coespeletia* Cuatrec. **INCI**, Caracas, v.29, n.1, p.13-18, 2004.
- ASSIS, T.F.; TEIXEIRA, S.L. Enraizamento de plantas lenhosas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S., BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. p. 261-296.

AZSCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, p.1-24, 1997.

BAGGIO J. A. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade Rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 17, p.25-32, 1988.

BERDWICK, A. **Aromaterapia holística**. Rio de Janeiro: Record, 1996. 270p.

BERTOLUCCI, S. K. V. ; CAPPELLE, E. R.; PINHEIRO, R. C. **Manipulação de fitoterápicos**. Lavras: UFLA/FAEPE, p.206, 2001.

BOEGER, M. R. T.; WISNIEWSKI, C. Comparação da morfologia foliar de espécies arbóreas de três estádios sucessionais distintos de floresta ombrófila densa (Floresta Atlântica) no Sul do Brasil. **Revista brasileira Botânica** v.26 n.1, 2003.

BOGGETTI, B.; JASIK, J.; MANTELL, S. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 456-461, 1999.

BONDADA, R.R.; OSTERHUIS, D.M.; MURPHY, J.B.; KIM, K.S. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and boll. **Environment and Experimental Botany**, v. 1, p. 61-69, 1996.

BORNHAUSEN, R. L. **As ervas do sítio; história, magia, saúde, culinária e cosmética**. São Paulo: M.A.S. p. 207, 1991.

BRANDÃO, L. R.; GONÇALVES, M. C. C.; PETRILLO, C. P.; COELHO, G. T. C. P.; SCHARFFERT, R.E. **Circular técnica**. n. 59 p.1-6, 2005.

BUKATSCH, F. Bemerkungen Zur; doppelfargung Astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, v.61, n.8, p.255, 1972.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**. v.21, n.1.234, p.26-30, 1997.

CALIXTO, J.B. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v.2, p. 261-279, 2001.

CARVALHO, C. P. DA S.; CORREIA, D.; BENBADIS, A. K.; LUZ, J. M. Q.; ROSSETTI, A. G. *In vitro* culture of *Spondias mombim* L. nodal segments. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24 n.3, 2000.

CARVALHO, M. C. R. D.; Avaliação da mutagenicidade do decocto das cascas de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Dissertação de mestrado**, Universidade federal do Rio Grande do Norte. p. 94, 2000.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: Anatomia vegetal (Apezzato–da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M.). Viçosa: UFV, 2003. p. 179-203.

COSTA, N.P. Desenvolvimento e teor de alcalóides em plantas de ipeca (*Cephaelis ipecacuanha*, A. Richard) obtidas *in vitro* submetidas às condições nutricionais em casa de vegetação. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de Lavras. p.61, 1995.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PEREIRA, M. A. A.; OLIVEIRA, J. P. Efeito da interação entre carvão ativado e N⁶-benzilaminopurina na propagação *in vitro* de bananeira, cv. grand naine (AAA). *Revista de Fruticultura Brasileira*, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 280-283, 2006.

CHUNG, K.T.; WONG, T.Y.; WEI, C.I.; HUANG, Y.W.; LIN, Y. Tannis and human health: A review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, p. 421-464 1998.

CUTTER, E.G. **Anatomia vegetal**. v.1 Rocca p.300, 1986.

DAS, S.; JHA, T. B.; JHA, S. *In vitro* propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, v.15, p. 615-619, 1996.

DEBERGH, P.C.; MAENE, L.J. Pathological and physiological problems related to *in vivo* culture of plant. **Parasitica**, Gembloux, v.40, p. 69-75, 1984.

DESJARDINS, Y.; GOSSELIN, A.; YELLE, S. Acclimatization of ex vitro strawberry plantlets in CO₂ - enriched environments and supplementary lighting. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.112, p.846-851, 1987.

DUCAN, R.R. **Tissue culture-induced variation and crop improvement**. Advances in agronomy, v.58 copyright p. 201, 1997.

ENGLER, A. **Anacardiaceae**: Anatomisches Verhalten. Leipzig: Die Natürlichen Pflanzenfamilien Bd, 1896. p. 139-140.

ERIG, A.C.; SCHUCH, M.W. Tipo de explante e controle da contaminação e oxidação no estabelecimento in vitro de plantas de macieira (*Malu domestica* Borkr) cvs. Galaxy, Maxigala e Mastergala. **Revista brasileira agrociência**, v.9 n. 3 p 221-227, 2003.

FERREIRA, A. Z. S. Propriedades e aplicações curativas da “aroeira-do-sertão” (*Myracrodruon urundeuva* Allemão – Anacardiaceae), na zona rural no município de caririaçu, Ceará Brasil. **Monografia de especialização**, Universidade regional da cariri, p.40, 2000.

FIDELIS, I. Micropropagação de *Brosimum guadichaudii* (mama-cadela) uma espécie considerada medicinal. Dissertação de mestrado Lavras: UFLA p. 109, 1998.

FIGUEIRÔA J. M.; BARBOSA D. C. A.; SIMABUKURO E. A. Crescimento de plantas jovens de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Acta Botanica Brasilica**. n.3 v.18, 2004.

FLICK, C. E.; EVANS, D. A.; SHARP, W.R.; **Basic techniques of plant cell culture**. Cap,2 p15-81.1986.

FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E. T. H.; MANTOVANI, N. Regeneração *in vitro* de espinheira santa (*Mautenus ilicifolia* Mart.). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4, n 3, p. 201-205, 1998.

FUNCAP Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico. **Validação científica das plantas medicinais 1999.** Disponível em: <<<http://www.funcao.ce.gov.br>>. Acesso em 10 jan. 2005.

GEORGE, E.F.; SHERRINGTON, P.D. **Plant propagation by tissue culture, handbook and directory of commercial laboratories.** Everley: Exegetics, 1984.p.709,

GOGTE, S.; NADGAUDA, R. Induction of somatic embryogenesis in cashewnut (*Anacardium occidentale* L.) **Society for *in vitro* Biology**, v.36 p 41-46, 2000.

GRATTAPAGLIA, D., MACHADO, M. A. micropropagação. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Brasília: EMBRAPA/CBAB, p.182-260, 1998.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** porto Alegre: UFRGS; p.15, 2001.

GUPTA, P.P. Erradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. **Plant Cell Tissui and Organ Culture**, v.6 p33-39, 1986.

GÜVENÇ, A. Anatomy of the Barks of *Rhus coriaria* L. **Tr. J. of Botany**, v. 22, p. 419-423, 1998.

IBRAHIM, R.H. Regulation of synthesis of phenolics. In: CONSTABEL, F.; VASIL, I.K. **Cell culture and somatic cell genetics of plant: cell culture in phytochemistry.** San Diego: Academic Press, 1987. v.4, p.77-95.

IPEF Instituto de pesquisa e estudo florestais. **Identificação de espécies florestais.** Disponível e, :<<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=30>> - 23k. Acesso em 15 jan. 2006.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13°. ed. São Paulo: Nacional, 2002.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New york: McGraw-hill Book Co., 1940.

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta mercantil**. n. 22170, Setembro, 2001.

KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin doublé staining methods for plants materials. **Biotech. Histochem** 1989.

LENZI, M.; ORTH A.I. Caracterização Funcional do sistema Reprodutivo da Aroeira vermelha (*Schinus Terebinthifolius* Raddi), Florianópolis-Sc, Brasil **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 198-201, Agosto 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa. Plantarum.p.20, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; Plantas Mediciniais: A Necessidade De Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, 2001.

MARTINS, E.R; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas medicinais**, Viçosa:Universidade Federal Viçosa,. P. 220, 2000.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4 ed. Fortaleza UFC,. p 257, 2002.

MARTÍNEZ-MILLÁN, M.; CEVALLOS-FERRIZ, S.R.S. Arquitectura foliar de Anacardiaceae. **Revista Mexicana de Biodiversidade** v.76 p. 137-190, 2005.

MAZZONI-VIVEIROS, S.C.; COSTA C.G. 2003. Peridreme. In: Anatomia vegetal (Apezatto –da-Glória, B.; Carmello-Guerreiro, S.M.). Viçosa: UFV. p. 237-260.

MEDEIROS, J.D. A biotecnologia e a extinção de espécies. **Biotecnologia e desenvolvimento**, n.30, p.109-113, 2003.

MEDEIROS, M.G.F. Influência dos adjuvantes tecnológicos na qualidade dos extratos secos atomizados da *Schinus terebinthifolius* Raddi “Aroeira da praia” (Anacardiaceae). 2001.. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Programa de pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRN, Natal, P.129, 2001.

MELO, B.; PINTO, J. E. B. P.; LUZ, J. M. Q.; PEIXOTO; J. R.; JULIATTI, F. C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões de guarirobeira [*Syagrus oleácea* (Mart.) Becc.]. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 25, n. 6, p.1301-1306, 2001.

McNAIR, J.B. Secretory canals of *Rhus diversiloba*. **Botanical Gazette**, v. 65, n. 3, p. 268-273, 1918.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Departamento de ciência farmacêutica, v.1, p.59, 2006.

MIGLIATO, K. F. Estudo farmacognóstico otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. **Dissertação de mestrado**. Universidade estadual paulista-SP. 2005.

MODGIL, M.; SHARMA, D.R.; BHARDWAJ, S.V. Micropropagation of apple cv. Tydemán’s Early Worcester. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.81, p.179-188, 1999.

MNENEY, E. E.; MANTELL, S. H. Clonal propagation of cashew (*Anacardium occidentale* L.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology**, v.77, n.6, p. 649-657, 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAIR, G. M.; VENKAIAH, K.; SHAH, J. J. Ultrastructure of gum-resin ducts in Cashew (*Anacardium occidentale*). **Annals of Botany**, v. 51, p. 297-305, 1983.

OLIVEIRA, A. J. B.; CARVALHO, V. M.; FERREIRA, A., SATO F.Y.; MACHADO F.P.S.; *in vitro* multiplication of *tabernaemontana fuchsiaeifolia* L.(apocynaceae) **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.27, n.4, p.421-425, 2006.

PAULS, K.P. Plant Biotechnology for crop Improvement. **Biotechnology Advances. S.I.**, v.13, n.4, p.673-693, 1995.

PIERIK, R.L.M. Preparación y composición de los medios nutritivos. In : **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madri, Ediciones Mundi Prensa, p.49-84, 1990.

PREECE, J.E.; SUTTER, E.G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: DEBERG, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. (Ed.) *Micropropagation technology and application*. Dordrecht: Kluwer **Academic Press**, 1991. p. 71-93.

RAGHUVANSHI, S.S.; SRIVASTAVA, A. Plant regeneration of *Mangifera indica* using liquid shaker culture to reduce phenolic exudation. **Plant cell, Tissue and Organ Culture**, v.41, p 83-85, 1995.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** v.39, p.603-, 2001.

RIBAS, M. O.; SOUSA, M. H.; SARTORETTO, J.; LANZONI; T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciência**, v. 21, n. 53, jul./set. 2006.

REUTERS. Brasil terá primeiro banco de dados de plantas medicinais. Folha on line, Brasil, 2002. Disponível em: <http://ww.uol.com.br/folha/reuters/ult112ul12329.shl>. Acesso: 12 set. 2006.

RUFFA, M. J.; et al. Cytotoxic effect of Argentine medicinal carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p.335-339, 2002.

SABÁ, R.T; LAMEIRA, O.A.; LUZ, J.M.Q.; GOMES, A.P.; INNECCO, R. Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 106-109, 2002.

SANT'ANNA-SANTOS B.F.; THADEO M.; MEIRA R. M. S.; ASCENSÃO A. L. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.3, p.481-489, 2006.

SANCHOTENE, M.M.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre, Feplam. P.311, 1985.

SASS, J. E. Elements of botanical microtechnique. New york. **McGarw-hill Book Co**. 22p. 1968.

SCHWENGBER, J.E.; RODRIGUES, A .C; RUFATO, L.; FORTES, G.R.L. Efeito de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multiplicação da microestacas do porta-enxerto de macieira cv. Mark. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 21, n.2, p.200-203. 1999.

SILVA, L.B.X.; REICHMANN NETO, F. Avaliação comparativa de desenvolvimento de 26 espécies florestais, em plantios homogêneos, no sudoeste paranaense. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 1990. v.3, p. 649-657. Publicado na Silvicultura, n.42, 1990.

SCHUCHOVSKI, C. S. Micropropagação da amoreira-preta cv. Brazos. **Scientia Agraria**, Paraná, v.3, n.1-2, p.113-132, 2002.

SHU-YING, M.A. Anatomical study on the stem and leaf of *Pistacia chinensis*. **Journal of Jilin Agricultural University**, v.21, n.1, 1999.

TAMURA, M. et al. Highly stable regeneration from long term cultures of Japanese persimmon callus. **Hortscience**, Alexandria, v. 27, n. 9, p. 148. 1992.

TEIXEIRA, J. B. Limitações ao processo de cultivo *in vitro* de espécies lenhosas. Disponível em: <<http://www.redbio.org/.../simposios/S-06/Joao%20Batista%20Teixeira/Palestra%20-%20Jo%20E3o%20Batista%20Teixeira>>. Acesso em 15 jan. 2006.

TORRES, D. M. G. **Catálogo de plantas medicinais (y alimentícias y utiles) usados em paraguay**. Asunción, 1981. p. 121-129.

TORRES, A.C.; CALDAS,L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. V.2. Brasília: EMBRAPA,1998.21p

TORRES, M.; JAUREGUI, D. Characterization of the leaf anatomy of four species of fruit tree: *Anacardium occidentale* L. (cashew); *Mangifera indica* L. (mango); *Spondias purpurea* L. (Spanish plum) and *Psidium guajava* L. (guava). **Ernstia**, v.9, p155-173, 1999.

TUROLLA, M. S.R.; NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira Ciência Farmacológica**. v.42, n.2 , 2006.

TZFIRA, T.; JENSEN, C. S.; VAINSTEIN, A.; ALTMAN, A. Transformation and regeneration of transgenic aspen plants via shoot formation from stem explants. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.99, p.554-561, 1997.

VENKAIKIAH, K.; SHAH, J. J. Distribution, development and structure of gum ducts in *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merrill (Anacardiaceae). **Annals of Botany**, v. 54, p. 175-186, 1984.

VIEIRA, R.C.; MACHADO, R.D. Superfície foliar de *Bauhinia radiata* Vell. em dois ambientes. **Hoehnea**, v.19, p.111-116, 1992.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneve, v.1, 2003.

A scenic view of a lake surrounded by lush green trees and grass, with the text "CAPÍTULO 4" overlaid in the center. The image shows a calm body of water in the middle ground, framed by dense green foliage on both sides. The foreground is filled with tall, green grasses. The sky is a pale blue with some light clouds. The text "CAPÍTULO 4" is written in a bold, black, serif font, centered horizontally and vertically over the lake area.

CAPÍTULO 4

APÊNDICE

Apêndice 1. Habitat natural de *Schinus terebinthifolius* Raddi próximo ao Rio Ceará-Mirim.

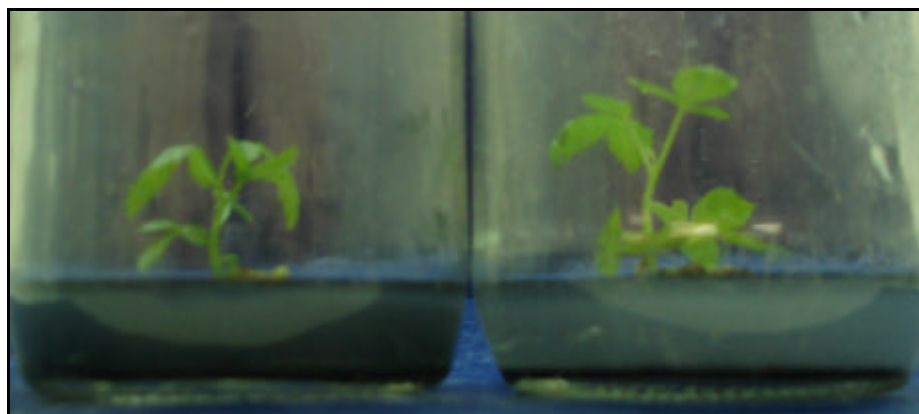


Apêndice 2. Mudanças de *Schinus terebinthifolius* Raddi germinadas em casa de vegetação.

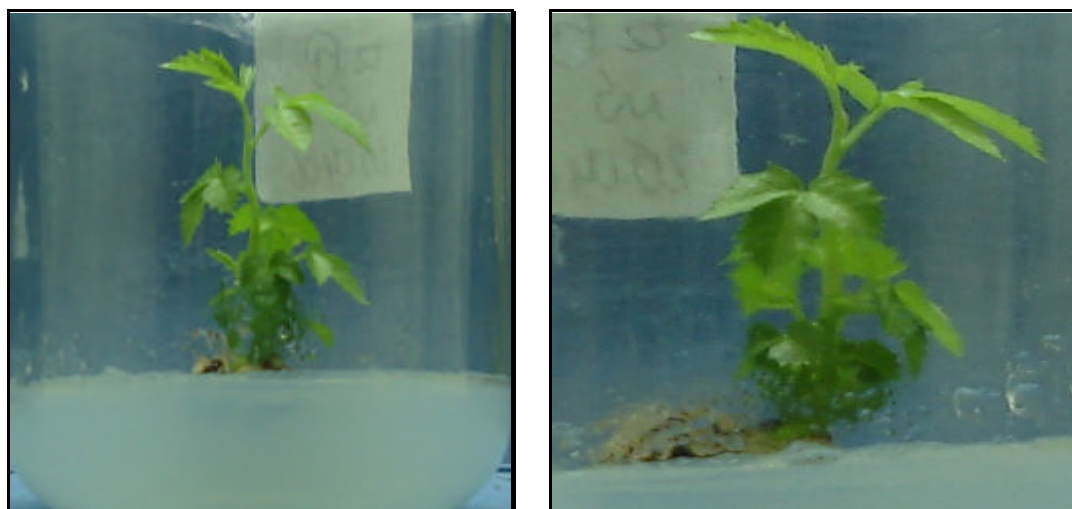


Muda com 2 meses (A), mudas com 8 meses (B).

Apêndice 3. Brotos formados através de explante de segmento nodal em meio com 10 g.L^{-1} carvão ativo.



Apêndice 4. Brotos formados através de explante de segmento nodal em meio com $4,5\mu\text{M}$ de BAP sem antioxidante.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)